

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Andrea Špolcová

NOVÉ FARMAKOLOGICKÉ INTERVENCE OVLIVŇUJÍCÍ  
PŘÍJEM POTRAVY

New pharmacological interventions influencing food intake  
regulation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Konuzultant: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru Z 40550506 AV ČR a byla podporována GA ČR, grant č. P303/10/1368.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....

Podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

V úvodu své práce bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha, v.v.i.) za její obětavou pomoc a konzultace při psaní mé diplomové práce i za čas, který mi věnovala při experimentální činnosti a svému vedoucímu práce RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. (Katedra analytické chemie, PřF UK).

Dále bych ráda poděkovala Ing. Blance Železné za konzultace a rady při psaní mé diplomové práce, RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D. za pomoc a rady při experimentální činnosti a celému pracovnímu kolektivu Dr. Jiřího Jiráčka za vytvoření milého pracovního prostředí. Také bych ráda poděkovala Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, Doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. za radioaktivní značení peptidů, Mgr. Miloslavu Šandovi, Ph.D. za měření hmotnostních spekter a RNDr. Renatě Haugvicové, CSc. (Chambon a.s.) za spolupráci při podání látek do mozku.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a příteli Tomášovi za podporu při mých studiích.

## ABSTRAKT

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) byl objeven jako endogenní ligand k sirotčímu GPR10 receptoru. Jeho první zjištěnou funkcí bylo zvyšování uvolňování prolaktinu (PRL) *in vitro* i *in vivo*. Tato funkce však byla zpochybněna a není pokládána za primární funkci PrRP. Skutečnost, že myši bez genu pro PrRP či GPR10 trpí hyperfagií a rozvíjí se u nich obezita, vedla k úvaze, že PrRP by mohl působit jako anorexigenní faktor. Noví agonisté PrRP by mohli mít selektivní dlouhotrvající anorexigenní účinek a antagonisté by mohli pomoci objasnit mechanismus působení PrRP a napomoci tak účinné léčbě obezity a metabolického syndromu. V naší nedávné studii (Maixnerová et al., Peptides (2011)) byla pomocí imunodetekce prokázána přítomnost receptoru pro PrRP u tří tumorových hypofyzárních buněčných linií. Pomocí saturačních vazebných experimentů byla charakterizována vazba PrRP k tomuto receptoru. PrRP31 a PrRP20, které se přirozeně vyskytují v organismu, vykazovaly srovnatelnou afinitu k receptoru, oba spouštěly buněčnou signalizaci a působily na zvýšení uvolňování PRL u buněčné linie RC-4B/C. Zároveň po injektování do třetí mozkové komory hladových myší působily na snižování příjmu potravy. V této práci byly prováděny experimenty s analogy PrRP20, u kterých byl koncový fenylalanin v pozici 31 modifikován na aromatickém kruhu. Analogy, které na C-konci měly aromatické jádro s navázanou halogenovou, hydroxylovou aj. skupinou měly zachovanou vysokou afinitu k receptoru i dobrou funkčnost při spouštění buněčné signalizace a uvolňování prolaktinu na RC-4B/C. Navíc anorexigenní efekt po centrálním podání těchto analogů hladovým myším byl prodloužený. Na snižování příjmu potravy také významně působil analog, kterému koncový fenylalanin chyběl.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Peptid uvolňující prolaktin

Analogy PrRP20

Receptor GPR10

## ABSTRACT

Prolactin-releasing peptide (PrRP) identified as an endogenous ligand of the orphan receptor GPR10 was originally found to stimulate the secretion of prolactin (PRL) both *in vitro* and *in vivo*. PrRP-mediated PRL secretion was later questioned and is not currently considered to be the primary function of PrRP. The fact that both PrRP and GPR10 knock-out mice are hyperphagic and develop late-onset obesity proves the unique anorexigenic properties of PrRP. Designing and evaluation of PrRP analog(s) with selective anorexigenic properties and searching for PrRP antagonists would contribute to finding the mechanism and possible treatment of obesity and metabolic syndrome. In our recent published study (Maixnerová et al., Peptides (2011)), the PrRP receptor was immunodetected and characterized by saturation binding in three rodent tumor pituitary cell lines. Two naturally occurring analogs, PrRP31 and PrRP20, showed comparable potency in binding, cell signaling and prolactin release in pituitary RC-4B/C cells, as well as caused food intake decrease after intracerebroventricular administration in fasted mice. In the present study, analogs of PrRP20 with C-terminal Phe amide derivatives with modified aromatic ring were used. Analogs with deleted Phe or containing Phe derivatives with bulky side chain or halogenated aromatic ring showed high binding potency and cell signaling in RC-4B/C cells. Moreover, their anorexigenic effect after central administration in fasted mice was long lasting.

## KEY WORDS:

Prolactin-releasing peptide  
Analog PrRP20  
Receptor GPR10

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
2.1	OBEZITA A MOŽNOSTI LÉČBY.....	11
2.1.1	Příčiny obezity.....	11
2.1.2	Léčba obezity.....	11
2.2	PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN (PrRP).....	12
2.2.1	Objev.....	12
2.2.2	Struktura.....	12
2.2.3	Struktura a objev receptoru GPR10.....	13
2.2.4	RF-amidy.....	13
2.2.4.1	Receptory pro RF-amidy.....	14
2.2.5	Výskyt PrRP v organismu.....	14
2.2.6	Výskyt GPR10 v organismu.....	15
2.2.7	Funkce PrRP v organismu.....	15
2.2.7.1	Stimulace vylučování hypofyzárních hormonů.....	16
2.2.7.1.1	Prolaktin (PRL).....	16
2.2.7.1.2	Oxytocin a vasopresin.....	17
2.2.7.2	Působení PrRP v hypothalamo-hypofýzo-adrenální (HPA) ose.....	17
2.2.7.3	Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů.....	18
2.2.7.4	Působení PrRP na regulaci příjmu potravy.....	19
2.2.7.4.1	Myši s modifikovaným genem pro PrRP či GPR10.....	20
2.2.8	Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP.....	21
2.3	ÚČINEK PrRP NA VYBRANÉ HYPOFYZÁRNÍ BUNĚČNÉ LINIE.....	22
2.3.1	RC-4B/C.....	22
2.3.2	GH3.....	24
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>25</b>
3.1	MATERIÁL.....	25
3.1.1	Chemikálie.....	25
3.1.2	Protilátky.....	26
3.1.3	Přístroje.....	26
3.1.4	Peptidy.....	27
3.1.4.1	Jodace peptidů.....	28
3.2	POKUSY <i>IN VITRO</i> .....	28
3.2.1	Pěstování buněčné hypofyzární linie RC-4B/C.....	28
3.2.2	Kompetitivní vazebné experimenty.....	29
3.2.3	Buněčná signalizace.....	30
3.2.3.1	Sběr vzorků.....	30
3.2.3.2	Western blot.....	30
3.2.3.2.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS.....	30

3.2.3.2.2	Přenos proteinů na PVDF membránu .....	31
3.2.3.2.3	Detekce proteinů na PVDF membráně .....	31
3.2.4	Stanovení prolaktinu v médiu hypofyzární buněčné linie RC-4B/C .....	32
3.2.4.1	Sběr vzorků .....	32
3.2.4.2	Stanovení prolaktinu .....	32
3.2.5	Vyhodnocení <i>in vitro</i> experimentů .....	32
3.3	POKUSY <i>IN VIVO</i> .....	33
3.3.1	Experimentální zvířata .....	33
3.3.2	Test příjmu potravy po podání analogů PrRP .....	33
3.3.2.1	Zavedení kanyly do třetí mozkové komory .....	33
3.3.2.2	Sledování příjmu potravy .....	34
3.3.3	Statistické vyhodnocení <i>in vivo</i> experimentů .....	35
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
4.1	POKUSY <i>IN VITRO</i> .....	36
4.1.1	Peptidy .....	36
4.1.1.1	Jodace peptidů .....	36
4.1.2	Pěstování hypofyzární buněčné linie RC-4B/C .....	36
4.1.3	Kompetitivní vazebné experimenty .....	36
4.1.4	Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB po působení analogů PrRP20 u hypofyzární buněčné linie RC-4B/C .....	39
4.1.5	Testování analogu [desPhe <sup>31</sup> ]PrRP20 na jeho případné antagonistické působení .....	42
4.1.6	Stanovení uvolňování prolaktinu v médiu hypofyzární buněčné linie RC-4B/C .....	43
4.1.7	Shrnutí výsledků <i>in vitro</i> experimentů .....	45
4.2	POKUSY <i>IN VIVO</i> .....	46
4.2.1	Ovlivnění příjmu potravy po ICV podání analogů PrRP .....	46
4.2.1.1	Ovlivnění příjmu potravy při různé dávce analogů PrRP20 .....	48
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
5.1	NOVÉ ANALOGY PrRP .....	49
5.2	POKUSY <i>IN VITRO</i> .....	50
5.3	POKUSY <i>IN VIVO</i> .....	52
5.4	VZTAH MEZI STRUKTUROU A AKTIVITOU JEDNOTLIVÝCH ANALOGŮ PrRP20 .....	53
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>61</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ACR – *Nucleus arcuatus*

ACTH – Adrenokortikotropní hormon

AgRP – *Agouti-related peptide*

AP – *Area postrema*

APS – Persíran amonný

BMI [ $\text{kg/m}^2$ ] – *Body mass index*

BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*)

BSA – Hovězí sérový albumin (*Bovine Serum Albumin*)

CART – *Cocaine and amphetamine regulated transcript*

CCK - Cholecystokinin

CNS – Centrální nervová soustava

CREB – *cAMP response element binding protein*

CRH - Kortikoliberin

[desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 – peptid uvolňující prolaktin bez koncového fenylalaninu v pozici 31

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle Medium*

DMN – Dorsomediální jádro

$EC_{50}$  [mol/l] – Efektivní koncentrace

EGF – Epidermální růstový faktor (*Epidermal Growth Factor*)

FBS – Fetální hovězí sérum (*Fetal Bovine Serum*)

FSH – Folikuly stimulující hormon

GH – Růstový hormon

GIT – Gastrointestinální trakt

GPR10 – Receptor spojený s G proteinem (*G-protein coupled receptor*)

GTP – Guanosintrifosfát

HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonová kyselina)

HPA osa – Hypotalamo-hypofýzo-adrenální osa (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*)

Cha - Cyklohexylalanin

$IC_{50}$  [mol/l] – Inhibiční koncentrace

ICV podání – Podání do třetí mozkové komory (Intracerebroventrikulární)

IP podání – Nitrobřišní podání (intraperitoneální)

$K_d$  [mol/l] – Rovnovážná disociační konstanta

$K_i$  [mol/l] – Rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu



LH – Luteinizační hormon  
 LHA – Laterální hypotalamická oblast  
 KO – Obecný termín pro jakýkoliv vyřazený gen (*knock-out*)  
 MAPK/ERK1/2 – Mitogenem aktivovaná proteinkináza/extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza 1/2  
 MCH – Melanin koncentrující hormon (*Melanin Concentrating hormone*)  
 ME – *Eminencia mediana*  
 mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina  
 NA – Noradrenalin  
 Nal – Naftylalanin  
 NPAD – Neuropeptid AF  
 NPFF – Neuropeptid FF  
 NPY – Neuropeptid Y  
 NTS – *Nucleus tractus solitarius*  
 PAGE – Polyakrylamidový gel  
 PEI – Polyethylenimin  
 Phg – Fenyglycin  
 POMC – Proopiomelanokortin  
 PRL – Prolaktin  
 PrRP – Peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*)  
 PVDF – Polyvinyliden difluorid  
 PVN – Paraventriculární jádro  
 RIA – Radioimunochemické stanovení (*Radioimmunoassay*)  
 SDS – Dodecylsulfát sodný  
 S.E.M. – Střední chyba průměru (*Standard Error of the Mean*)  
 TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin  
 TRH – Tyreoliberin (*Thyrotropin-Releasing Hormone*)  
 TSH – Tyreotropin (*Thyroid-Stimulating Hormone*)  
 UCP-1 – *Uncoupling protein 1*  
 UHR-1 – Potkaní analog receptoru pro PrRP (*Unknown hypothalamic receptor-1*)  
 VLRN – Ventrolaterální retikulární jádro  
 VMN – Ventromediální jádro

# 1 ÚVOD

---

Obezita jako stále rostoucí problém zemí vyspělých, ale i rozvíjejících se, pro který zatím neexistují účinné terapie, vede k velkému rozvoji výzkumu v oblasti regulace příjmu potravy. V posledním desetiletí 20. století byla objevena celá řada látek, které regulaci energetického metabolismu zásadně ovlivňují, jako např. periferní hormon leptin a ghrelin, ale také neuropeptidy jako peptid CART (*Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript*) nebo peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*, PrRP). Ačkoliv od objevu PrRP v roce 1998 uplynulo již 13 let, jeho přesná funkce v organismu stále není objasněna. Fakt, že tento peptid působí centrálně na snížení příjmu potravy, z něj činí látku potenciálně zajímavou pro možnou léčbu obezity. V této studii byly testovány analogy PrRP modifikované na C-koncovém fenylalaninu s cílem nalézt látky působící selektivně na snížení příjmu potravy po centrálním podání.

## Cíle práce

V rámci studií vztahu mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP20:

1. Testovat analogy PrRP20 *in vitro* na hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a určit vliv modifikací fenylalaninu v pozici 31 na aktivitu analogů PrRP20.
2. Určit anorexigenní aktivitu analogů PrRP20 po centrálním podání myším samcům kmene C57Bl/6.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

---

### 2.1 OBEZITA A MOŽNOSTI LÉČBY

#### 2.1.1 Příčiny obezity

Odhaduje se, že asi 1 miliarda světové populace trpí nadváhou a 300 milionů populace obezitou. Obezita není pouze estetický problém, jak se dříve myslelo, ale pojí se i se závažnými, život ohrožujícími chorobami, jakými jsou např. *diabetes mellitus*, vysoký krevní tlak apod. [1].

Jedním z důvodů takového rozšíření obezity je změna životního stylu v rozvinutých zemích. Zde je vyšší dostupnost a konzumace potravin či nápojů s vysokým obsahem kalorií a zároveň nižší fyzická aktivita, tudíž i energetický výdej [2]. Zvýšený výskyt obezity je způsoben i tím, že zatímco signály sytosti jsou stále stejné, smyslové vjemy, které ovlivňují chuť k jídlu, čímž zvyšují příjem potravy, jsou přesycovány množstvím podnětů z okolí, jako je vůně jídla, lepší chuť atd. Tělo tak není schopno účinně regulovat příjem potravy, dochází k přejídání, tudíž i nadváze, popř. obezitě [3].

Obezita je charakterizována nadměrným ukládáním tuku. Stupeň obezity je možné určit pomocí *body mass index* (BMI), který se vypočítá jako hmotnost v kilogramech dělená výškou v metrech umocněnou na druhou (hmotnost [kg]/ výška [m<sup>2</sup>]). Stupeň 1 se nazývá nadváha a BMI se nachází mezi 25-29,9 kg/m<sup>2</sup>, stupeň 2 obezita, když je BMI 30-39,9 kg/m<sup>2</sup> a stupeň 3 morbidní obezita, když je BMI vyšší nebo rovno 40 kg/m<sup>2</sup> [4].

#### 2.1.2 Léčba obezity

Pro účinnou léčbu obezity je nutné porozumět regulaci příjmu potravy a řízení energetické rovnováhy. Na těchto pochodech se podílí složité a komplexní procesy, které závisí na schopnosti mozku přijímat, integrovat a odpovídat na širokou škálu signálů přicházejících z periferie i z jiných oddílů CNS a které mozek informují o nutričním a energetickém stavu organismu. Následně pak z mozku vycházejí příslušné signály odpovídající na potřeby jedince. Jedním z nejdůležitějších center pro regulaci příjmu potravy je hypotalamus [5].

V současné době není na trhu mnoho léků, které by účinně snižovaly příjem potravy a tím i regulovaly hmotnost. Jediným lékem dostupným v ČR je Orlistat, inhibitor střevní lipázy, který snižuje vstřebávání tuků z tlustého střeva. Má však vedlejší účinky, např. průjemy. V nedávné době byl stažen z trhu Rimonabant, selektivní blokátor kanabinoidních receptorů CB1, při jehož užívání se objevovaly deprese (v Čechách na trhu nikdy nebyl) a Sibutramin, inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, který navozuje pocit sytosti, při jehož užívání bylo zvýšené riziko výskytu srdečních chorob [6]. U pacientů s morbidní obezitou či u pacientů s rozvinutými chorobami pojíícími se s obezitou je možné podstoupit chirurgickou léčbu – bariatrický zákrok. U nás je nejčastěji prováděna laparoskopická bandáž žaludku, při které se kolem horní části žaludku obtočí silikonový kroužek, čímž dojde ke zmenšení objemu žaludku a tím i ke snížení pocitu hladu [6].

Je nezbytně nutné provádět základní výzkum a zkoumat účinky nově objevených peptidů, které se podílí na regulaci příjmu potravy. Analogy anorexigenních látek, které působí na snížení příjmu potravy, popř. antagonisté orexigenních látek, které naopak zvyšují příjem potravy, by mohly být účinná antiobezitní léčiva, která by nemusela mít vedlejší účinky [7].

Jedním z nově objevených neuropeptidů, jehož analogy by mohly být potenciální antiobezitika, je peptid uvolňující prolaktin.

## 2.2 PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN (PrRP)

### 2.2.1 Objev

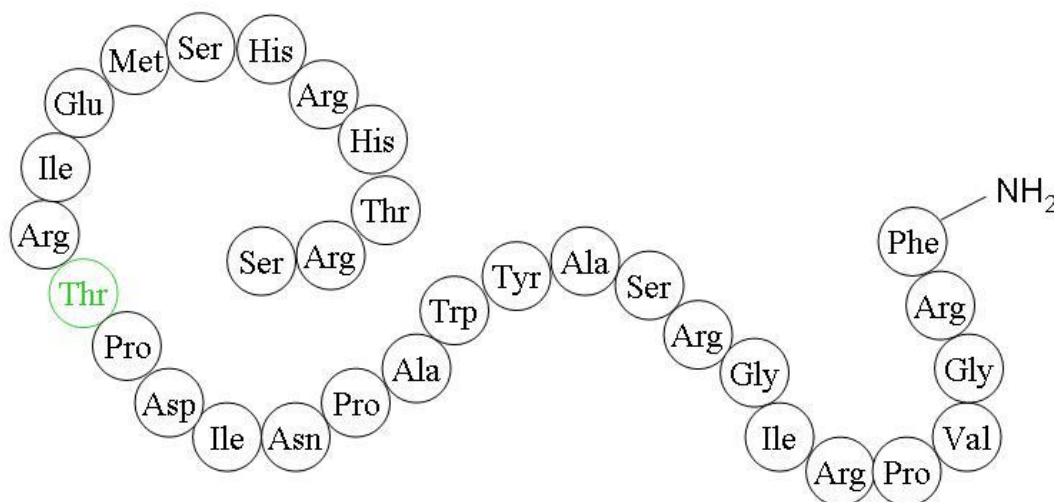
Peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*, PrRP) byl objeven v roce 1998 jako endogenní ligand k sirotčímu receptoru GPR10 (receptor, pro který není znám žádný ligand) v extraktu z hovězího hypotalamu metodou tzv. obrácené farmakologie. Jeho první zjištěnou funkcí byla stimulace vylučování prolaktinu (PRL). Odtud tedy pochází jeho název [8].

### 2.2.2 Struktura

Bylo zjištěno, že v organismu se vyskytují dvě formy PrRP, které vznikají z jednoho prepropeptidu [8]. Ten je u různých živočišných druhů různě dlouhý (98 aminokyselin u skotu, 87 u člověka, 83 u krys a 82 u myši), avšak jeho sekvence je téměř identická, což značí, že PrRP hraje v organismu důležitou úlohu [9]. Posttranskripčními úpravami

vzniká z prepropeptidu, který obsahuje dvě štěpná místa, peptid s 31 aminokyselinami (PrRP(1-31); PrRP31) a peptid s 20 aminokyselinami (PrRP(12-31); PrRP20) [8]. Struktura peptidu je uvedena na obrázku (Obr. 1).

PrRP patří mezi tzv. RF-amidy, jelikož na C-konci peptidového řetězce se vyskytují aminokyseliny arginin a fenylalanin, který je amidován [9].



**Obr. 1 Lidský analog PrRP31**

*Zeleně je označen threonin v pozici 12, počátek PrRP20*

### 2.2.3 Struktura a objev receptoru GPR10

Receptor GPR10 (jiné označení hGR3, či UHR-1, který se vyskytuje u potkanů) byl objeven v roce 1995. Peptidový řetězec je tvořen 369 aminokyselinami a receptor patří k receptorům spřažených s G proteinem sedmkrát procházejících membránou [10]. Největší podobnost má s receptorem pro neuropeptid Y (NPY). Tyto receptory se zřejmě vyvinuly z jednoho původního receptoru [11].

### 2.2.4 RF-amidy

RF-amidy jsou neuropeptidy, pro které je charakteristické, že na C-konci peptidového řetězce se vyskytují aminokyseliny arginin (R) a fenylalanin (F), který obsahuje ještě amidovou skupinu, která je velmi důležitá pro vazbu peptidu na receptor [9, 12].

Bylo zjištěno, že geny pro RF-amidy se objevily velmi brzy ve vývoji; vyskytovaly se již v primitivních nervových soustavách, kde se podílely na přenosu nervového vzruchu [12]. I první RF-amid byl objeven v nervové soustavě a to u škeble (*Macrocallista nimbosa*). Při dalších výzkumech byly RF-amidy objeveny u mnoha bezobratlých živočichů, u kterých se tyto peptidy vyskytují ve velkém počtu (např. hlístice *Caenorhabditis elegans* má 22 genů pro RF-amidy, ze kterých vzniká 59 různých RF-amidů). Následně byly RF-amidy objeveny i u obratlovců. První peptid byl izolován z kuřecího mozku a byl to LPLRF-NH<sub>2</sub> [13].

U savců bylo do této doby objeveno 5 genů kódujících RF-amidy. Z jednoho genového transkriptu obvykle vzniká posttranskripčními úpravami více peptidů. Mezi savčí RF-amidy patří: neuropeptid FF (NPFF) a neuropeptid AF (NPAF), PrRP31 a PrRP20, metastatin, RFRP-1 a RFRP-3 a 26-RF-NH<sub>2</sub>. Tyto peptidy mají širokou škálu účinků [12]. Ovlivňují např. kardiovaskulární systém, uvolňování různých hormonů, svalovou kontrakci apod. Mnoho RF-amidů se vyskytuje v oblastech mozku, které se podílí na regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy. Zda tyto peptidy skutečně příjem potravy ovlivňují, je nyní předmětem vědeckého zkoumání [12, 13].

#### 2.2.4.1 Receptory pro RF-amidy

Receptory pro savčí RF-amidy patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Díky podobnosti peptidů na C-konci důležitém pro afinitu peptidu k receptoru a amidové skupině dochází k tomu, že na jeden receptor se může vázat několik ligandů z rodiny RF-amidů. Bylo např. prokázáno, že k receptoru pro NPFF se váží savčí RF-amidy s vysokou afinitou v řádu 10<sup>-8</sup> mol/l (samotný NPFF má afinitu v řádu 10<sup>-9</sup> mol/l). Při funkčních experimentech s receptorem pro NPFF bylo prokázáno, že při vazbě PrRP31 na NPFF receptor je aktivováno vyšší množství guanosintrifosfátu (GTP) ve srovnání s GTP aktivovaným při působení NPFF. GTP se následně váže na  $\gamma$  podjednotku G proteinu, čímž aktivuje receptor a spouští buněčnou signalizaci [14].

Výjimku tvoří receptor GPR10, který má zachovanou vysokou selektivitu pro vazbu PrRP a ostatní RF-amidy se na něj neváží [14].

#### 2.2.5 Výskyt PrRP v organismu

Neurony, ve kterých je tvořen PrRP, byly objeveny v mnoha částech mozku. Nejvíce mRNA pro PrRP však bylo objeveno v *nucleus tractus solitarius* (NTS) a ve ventrolaterálním retikulárním jádru (VLRN), které se nachází v prodloužené míše a v paraventriculárním jádru (PVN) a dorsomediálním jádru (DMN), která jsou

v hypotalamu [15, 16]. Méně se pak neurony tvořící PrRP vyskytují v předním i zadním laloku hypofýzy [17, 18] a v amygdale [15]. Mezi samci a samicemi nebyl pozorován rozdíl v počtu neuronů, které produkují PrRP [16]. Nebyly pozorovány ani mezidruhové rozdíly ve výskytu PrRP [18, 19].

V periferních tkáních byl PrRP nalezen ve dřeni nadledvin, varlatech, slinivce břišní [20, 21] a v tenkém i tlustém střevě [22].

Bylo zjištěno, že u samic dochází k významnému zvýšení množství mRNA pro PrRP po podání estradiolu. Ke zvýšené transkripci mRNA pro PrRP dochází i u samic v proestru (ve folikulární části sexuálního/pohlavního cyklu), ve které je taktéž vylučováno vyšší množství estrogenů [23, 24].

### 2.2.6 Výskyt GPR10 v organismu

V CNS se receptor pro PrRP vyskytuje na více místech než PrRP. Neurony produkující receptor byly objeveny v hypotalamu v PVN, periventrikulárním jádru (PerVN), DMN, ventromediálním jádru (VMN), v předním laloku hypofýzy, v amygdale, v mozковém kmeni v *area postrema* (AP), v NTS a ve VLRN [8, 15, 22, 25, 26]. Avšak v periferních tkáních byl receptor GPR10 objeven pouze v dřeni nadledvin [20, 21]. U samic byl zjištěn vyšší počet receptorů pro PrRP než u samců [27].

### 2.2.7 Funkce PrRP v organismu

PrRP má v organismu více úloh. První zjištěnou funkcí PrRP bylo zvyšování uvolňování prolaktinu [8]. Následně však bylo zjištěno, že uvolňování prolaktinu není ovlivněno u potkaních samců, tudíž že vylučování prolaktinu není primární úlohou PrRP [27].

Díky objevu PrRP v hypotalamických jádrech PVN a DMN, která jsou důležitá pro udržování energetické rovnováhy, se o PrRP začalo uvažovat jako o faktoru ovlivňujícím příjem potravy [28]. Výskyt PrRP a jeho receptoru v dalších oblastech mozku pak naznačují, že PrRP působí i při regulaci odpovědi na stres, na bolestivé podněty apod. [29].

### 2.2.7.1 Stimulace vylučování hypofyzárních hormonů

#### 2.2.7.1.1 Prolaktin (PRL)

Zvýšení uvolňování PRL bylo první popsanou funkcí PrRP. Jelikož bylo zjištěno, že PrRP neovlivňuje uvolňování jiných hypofyzárních hormonů, předpokládalo se, že byl objeven selektivní faktor ovlivňující uvolňování PRL, který do té doby nebyl znám [8]. Následnými imunohistochemickými experimenty však nebyla potvrzena přítomnost neuronů tvořících PrRP ve vnější vrstvě hematoencefalické membrány *eminencia mediana* (ME), tj. dolní stěně třetí mozkové komory, ze které jsou vylučovány všechny ostatní hypotalamické liberiny i statiny ovlivňující uvolňování hypofyzárních hormonů [15, 25].

Při dalších pokusech bylo zjištěno, že účinek PrRP na uvolňování PRL se liší u samic a samců. *In vitro* na primárních buňkách získaných z potkaní adenohipofýzy i *in vivo* u potkanů bylo prokázáno, že u samců působí PrRP na uvolnění PRL pouze ve velmi vysokých dávkách (10 či 100 nmol *in vitro*, 500 nmol/kg *in vivo*), zatímco u samic stačí k významnému uvolňování PRL dávka nižší [30-32]. U samic potkanů dále dochází k rozdílnému zvýšení uvolnění PRL po podání PrRP v závislosti na stádiu pohlavního/sexuálního cyklu, což je způsobeno nejspíše různou koncentrací estradiolu v krvi. Nejvyšší koncentrace PRL v krvi po podání PrRP byla naměřena u samic v proestru a estru, kdy je zvýšena produkce estradiolu, méně pak u samic v metestru. PrRP významně nepůsobil na vylučování PRL u samic v diestru, kdy je naopak hladina estradiolu v krvi nízká [31, 32].

Nejvyšší účinnost vykazuje PrRP při společném injektování s tyreoliberinem (TRH) do třetí mozkové komory potkaních samic. TRH je považován za hlavní faktor stimulující v organizmu vylučování PRL, tudíž je možné, že PrRP pouze zvyšuje účinek TRH. Jelikož bylo zjištěno, že PrRP ovlivňuje uvolňování PRL, i když se nevyskytuje v *eminencia mediana*, předpokládá se, že nepůsobí jako typický hypotalamický hormon, ale že funguje jako parakrinní či autokrinní faktor [33]. Tyto objevy naznačují, že PrRP hraje úlohu v uvolňování PRL, avšak že stimulace vylučování PRL z hypofýzy není jeho hlavní funkcí v organizmu.



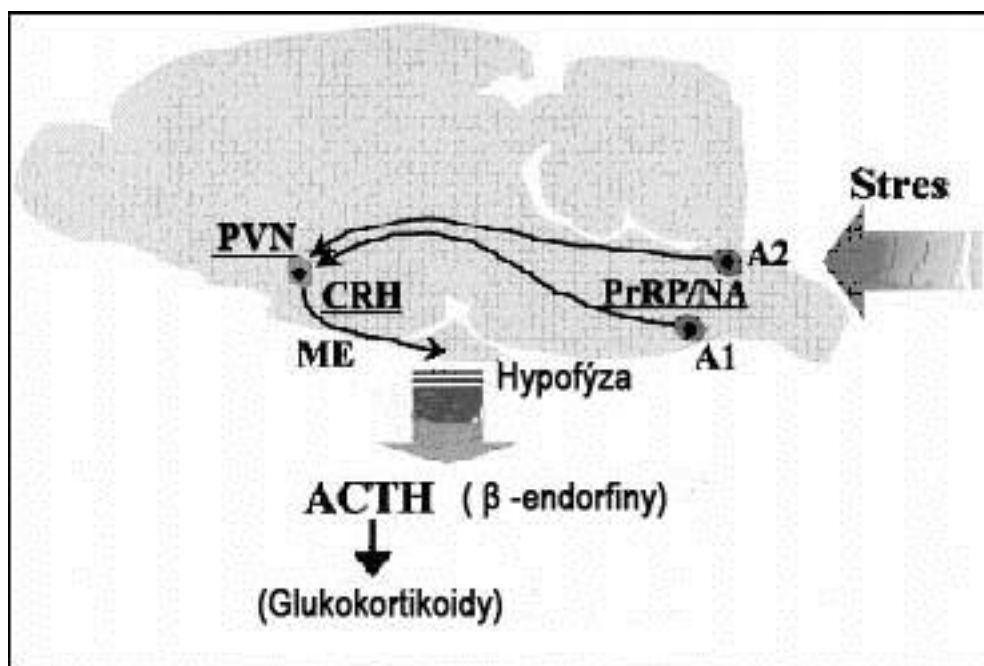
#### **2.2.7.1.2 Oxytocin a vasopresin**

Pomocí imunocytochemické analýzy bylo prokázáno, že neurony produkující PrRP jsou v kontaktu s neurony produkujícími oxytocin a vasopresin v PVN [15, 34]. Při injektování PrRP do třetí mozkové komory potkanů došlo k významnému zvýšení hladiny oxytocinu v krvi u samic i samců, zatímco vyšší hladina vasopresinu v krvi byla pozorována pouze u samic. PrRP by tak mohl hrát úlohu i v osmotické regulaci a při reprodukci [34].

#### **2.2.7.2 Působení PrRP v hypotalamo-hypofýzo-adrenální (HPA) ose**

Pomocí imunohistochemických experimentů na řezech získaných z potkaní prodloužené míchy bylo zjištěno, že mRNA pro PrRP se vyskytuje v neuronech v NTS (A2 oblast) a VLRN (A1 oblast), ve kterých jsou zároveň tvořeny katecholaminy důležité při odpovědi na stresové podněty. Při aktivaci těchto neuronů, jejichž vlákna končí v PVN v hypotalamu, je stimulováno uvolnění kortikoliberinu (CRH), který zvyšuje uvolňování adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z předního laloku hypofýzy [22, 35-37], ACTH pak ovlivňuje vylučování glukokortikoidů z kůry nadledvin [38].

Bylo zjištěno, že injektování PrRP do třetí mozkové komory potkanů zvyšuje koncentraci CRH i ACTH v krevní plazmě [36, 37, 39]. Při současném injektování antagonisty receptoru pro CRH a PrRP ke zvýšení hladiny ACTH nedojde. Je tedy zřejmé, že pro působení PrRP v HPA ose je důležitý aktivní receptor pro CRH [35]. K výraznému zvýšení koncentrace ACTH v krevní plazmě dochází po společném podání PrRP a noradrenalinu (NA), což potvrzuje, že PrRP působí v HPA ose jako faktor zvyšující koncentraci CRH [22, 38]. Schéma působení PrRP na HPA osu je uvedeno na obrázku (Obr. 2).



**Obr. 2 Úloha PrRP v HPA ose [38]**

*PrRP má vliv na uvolňování kortikoliberinu (CRH), adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a glukokortikoidů*

*A1 – ventrolaterální retikulární jádro, A2 – nucleus tractus solitarius,  
PVN – paraventriculární jádro hypotalamu, ME – eminencia mediana, NA – noradrenalin,  
PrRP – peptid uvolňující prolaktin*

### 2.2.7.3 Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů

Při imunohistochemických pokusech na řezech z potkaních hypotalamů bylo zjištěno, že neurony exprimující PrRP se nachází v parabrachiálním jádru, které se podílí na regulaci odpovědi na bolestivé podněty. V těchto neuronech jsou zároveň tvořeny i enkefaliny, které se vážají na opioidní receptory, čímž tlumí bolestivé podněty [39].

Pro objasnění funkce PrRP při vnímání bolestivých podnětů byly prováděny studie na myších s vyřazeným receptorem GPR10. Byl u nich pozorován vyšší práh vnímání bolestivých podnětů a vyšší analgeze, která se vyvinula při působení stresovými podněty. Zároveň kontrolní jedinci vykazovali hyperalgezi (vyšší vnímání bolestivých podnětů) a sníženou odpověď na analgetické účinky morfinu. Bylo tedy prokázáno, že PrRP působí jako antagonist opiatového systému [40].

#### 2.2.7.4 Působení PrRP na regulaci příjmu potravy

PrRP se vyskytuje v oblastech mozku, které jsou velmi důležité pro řízení energetické rovnováhy. Prvním z nich je PVN [28], do kterého ústí populace primárních neuronů z *nucleu arcuatu* (ARC), ve kterých jsou tvořeny anorexigenní peptidy proopiomelanokortin (POMC) a CART a populace primárních neuronů tvořících orexigenní peptidy NPY a *Agouti-Related Peptide* (AgRP). Tyto neuropeptidy pak působí v PVN na uvolňování dalších anorexigenních peptidů, kterými jsou např. CRH, TRH a oxytocin [41]. Druhým důležitým jádrem je DMN [28], do kterého taktéž ústí obě populace primárních neuronů z ARC. Při poničení DMN dochází k hyperfagii (přejídání) a obezitě, přitom však obsahuje velké množství nervových zakončení z neuronů produkujících orexigenní peptidy [1]. Z ARC jsou orexigenní a anorexigenní populace neuronů projektovány i do laterální hypotalamické oblasti (LHA), tzv. centra hladu, ze které jsou vylučovány další orexigenní peptidy, kterými jsou například hormon orexin či melanin koncentrující hormon (MCH) [41]. Jak je tedy patrné, pro regulaci příjmu potravy je velice důležitý ARC, do kterého přichází signály z periferie, a který vysílá signály do dalších center CNS. Při poničení tohoto jádra (např. glutamátem sodným) dochází k hyperfagii a obezitě [1].

Po injektování PrRP31 do třetí mozkové komory, jejíž přední stěna a dno jsou tvořeny hypotalamem (tzv. intracerebroventrikulární podání, ICV) došlo u potkanů k významnému snížení příjmu potravy, které dále způsobilo snížení hmotnosti [28, 42]. Toto snížení potravy neovlivnilo příjem vody ani chování pokusných zvířat. Nebyla prokázána ani nevolnost a nechutenství, ke kterému může docházet po podání látek, které působí na snížení příjmu potravy, jako k nežádoucímu vedlejšímu efektu [43].

Že PrRP působí jako anorexigenní látka, bylo prokázáno i při dalších experimentech. Při těch bylo zjištěno, že při negativní energetické bilanci, ke které dochází např. při kojení či při hladovění, dochází ke snížené transkripci mRNA pro PrRP. To je typické i pro další anorexigenní peptidy, jako je např. peptid CART či POMC [28, 44]. Navíc ICV podání PrRP působí na snížení příjmu potravy u hladových potkanů [28].

K redukci hmotnosti po ICV injekci PrRP nedochází pouze díky snižování příjmu potravy, jelikož u potkanů, kterým bylo podáváno takové množství potravy, které bylo zkonsumováno potkany po injektování PrRP do třetí mozkové komory (tzv. párově krmení jedinci), nedocházelo ke srovnatelné redukci hmotnosti. Po podání PrRP je zvýšena tělesná teplota a spotřeba kyslíku, což jsou nepřímé důkazy zvýšeného

energetického výdeje. Je vyšší i produkce mRNA pro *uncoupling protein 1* (UCP-1) v hnědé tukové tkáni, což taktéž poukazuje na zvýšený energetický výdej [45].

Na účinek PrRP mají vliv i jiné endogenní látky působící na regulaci energetické rovnováhy. K prohloubení účinku na snížení příjmu potravy dochází po společném podání PrRP a leptinu [44], hormonu, který je vylučován z buněk tukové tkáně, přes hemoencefalickou membránu proniká do mozku, kde inhibuje tvorbu orexigenních peptidů a stimuluje tvorbu anorexigenních peptidů, čímž dochází k dlouhodobé regulaci energetické rovnováhy a ke snižování příjmu potravy [46, 47]. Receptory pro leptin pak byly objeveny na neuronech, které produkují PrRP, což naznačuje, že leptin by mohl ovlivňovat PrRP [44]. Druhým endogenním peptidem působícím na PrRP je cholecystokinin (CCK). Tento peptid je vylučován z periferie i CNS a způsobuje krátkodobé snižování příjmu potravy [48]. Po intraperitoneálním (IP) injektování CCK potkanům došlo k aktivaci neuronů produkujících PrRP v NTS a VLRN, což naznačuje, že PrRP by se mohl podílet na aktivaci signálů CCK z periferie do CNS [43].

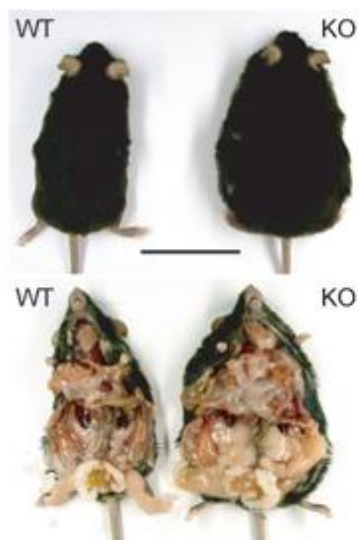
#### **2.2.7.4.1 Myši s modifikovaným genem pro PrRP či GPR10**

Ke zjišťování funkcí PrRP v organismu *in vivo* byla také využívána geneticky modifikovaná zvířata (tzv. *knock-out*, KO), což jsou zvířata, kterým byl záměrně pozměněn gen kódující PrRP či receptor GPR10, aby nemohlo docházet k translaci a peptid či receptor se v organismu vůbec nevyskytoval [49, 50].

Zvířata, u kterých není syntetizován PrRP (tzv. PrRP KO) trpí hyperfagií, která zapříčiňuje obezitu. Jelikož není ovlivněna frekvence jednotlivých dávek potravy, přestože dochází k vyšší konzumaci potravy, dochází i ke zvětšení každé jedné dávky jídla. S obezitou se pojí i vyšší hladina leptinu v krvi, později i glukózová intolerance a inzulinová rezistence. U těchto jedinců nedochází ke snížení energetického výdeje, jelikož tělní teplota i spotřeba kyslíku jsou srovnatelné s kontrolními jedinci. Nefunkčnost PrRP tedy zapříčiňuje obezitu, která je vyvolána vyšším příjmem potravy a vyšším ukládáním tuků. Zvýšené ukládání tuku oproti jedincům s funkčním genem pro PrRP je patrné z obrázku (Obr. 3) [49, 51].

U jedinců s nefunkčním receptorem GPR10 (tzv. GPR10 KO) docházelo také k vyššímu příjmu potravy a tím i k obezitě. U samic byla obezita vyšší než u samců díky sníženému energetickému výdeji. S obezitou se pojila taktéž zvýšená hladina leptinu, cholesterolu a glukózová intolerance [50, 52]. Zároveň bylo zjištěno, že u GPR10 KO nebyl snížen příjem potravy ani po podání CCK, což potvrzuje hypotézu, že systém GPR10-PrRP by mohl hrát klíčovou úlohu v přenosu signálu CCK, který

navozuje pocit sytosti při příjmu potravy. NPFF, který také snižuje příjem potravy, měl u GPR10 KO funkci zachovanou, z čehož vyplývá, že pro fungování PrRP při příjmu potravy je receptor GPR10 nepostradatelný [53].



**Obr. 3 Myši s modifikovaným genem pro PrRP [49]**

WT (wild type) – kontrolní jedinci s genem pro PrRP

KO – myši s modifikovaným genem

### 2.2.8 Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP

V těle se přirozeně vyskytují dvě formy PrRP (PrRP31 a PrRP20), které mají stejnou afinitu k receptoru a jejichž biologická aktivita je srovnatelná *in vitro* i *in vivo* [54]. Výměna koncové amidové skupiny za karboxylovou skupinu vedla k úplné ztrátě schopnosti vázat se na GPR10 receptor [22]. Některé studie tvrdí, že nejkratší analog PrRP, který má ještě zachovanou aktivitu srovnatelnou s PrRP31 a 20, je PrRP(19-31) (tzv. PrRP13), tudíž že tento peptid je vhodným základním peptidem pro syntézu analogů, které by účinně mohly ovlivňovat příjem potravy [55]. Naše studie však ukázala, že PrRP13 má afinitu k receptoru nižší a jeho biologická aktivita *in vitro* i *in vivo* je také snížena [54, 56]. Struktura PrRP13 je na obrázku (Obr. 4).

Při studiích vztahu mezi aktivitou peptidu a jeho strukturou bylo zjištěno, že nejkratší peptid, který má ještě částečně zachovanou afinitu k receptoru GPR10, je koncový heptapeptid PrRP(25-31). Tyto výsledky byly získány při dvou nezávislých studiích. První z nich byla prováděna tzv. alaninovým skenem, kdy byly postupně měněny aminokyseliny vyskytující se v C-koncovém heptapeptidu za alanin, čímž bylo prokázáno, které aminokyseliny jsou důležité pro zachování biologické aktivity peptidu [22]. Druhá studie byla prováděna výměnou přirozeně se vyskytujících aminokyselin na C-konci PrRP za různé jiné kódové i nekódové aminokyseliny [55].

Pro správnou funkci PrRP je nezbytně nutná přítomnost argininu v pozici 30. Při jeho modifikaci či záměně za jinou aminokyselinu docházelo k úplné ztrátě vazby k receptoru i biologické aktivity. Pro vazbu k receptoru GPR10 je důležitá přítomnost fenylalaninu v pozici 31, či jiné aminokyseliny s aromatickou skupinou navázanou na minimálně jedné skupině  $\text{CH}_2$ , která zajišťuje stericou specifitu. Záměnou dalších aminokyselin z heptapeptidu nedochází k výraznému ovlivnění aktivity [55].

Pro charakterizaci vazby analogů PrRP na receptor jsou nejčastěji využívány vazebné experimenty s ligandem značeným radioaktivním izotopem jódu,  $^{125}\text{I}$ . Tento izotop se váže na tyrosin v pozici 20 [57]. Jak bylo zjištěno, navázání jedné molekuly jódu neovlivní chování PrRP při vazbě k receptoru [54].



**Obr. 4 Struktura PrRP(19-31)**

*Červeně zvýrazněné aminokyseliny jsou důležité pro správnou biologickou funkci PrRP [55].*

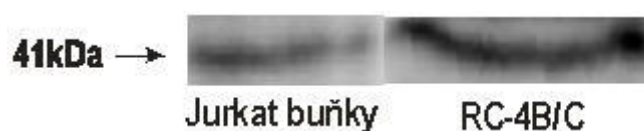
## 2.3 ÚČINEK PrRP NA VYBRANÉ HYPOFYZÁRNÍ BUNĚČNÉ LINIE

### 2.3.1 RC-4B/C

RC-4B/C je epiteliální buněčná linie, která byla získána z potkaního adenohypofyzárního adenomu, což je nezhoubný nádor. Obsahuje všechny typy buněk, které se přirozeně vyskytují v adenohypofýze, kterými jsou adrenokortikotropy, gonadotropy, laktotropy, somatotropy a tyreotropy. Ze strukturálního hlediska jsou tyto buňky shodné s diferencovanými buňkami předního laloku hypofýzy, ale oproti zdravé hypofyzární tkáni se zde vyskytuje o 20 % více buněk produkujících luteinizační hormon (LH) a o 12 % méně buněk produkujících růstový hormon (GH). Počet buněk vylučujících ACTH, folikuly stimulující hormon (FSH), PRL a tyreotropin (TSH) zůstává nezměněný [58].

Vylučování PRL z buněk RC-4B/C po působení PrRP bylo prvně prokázáno Hinumou a kol. [8]. Bylo prokázáno, že tato buněčná linie je vhodná k testování účinků

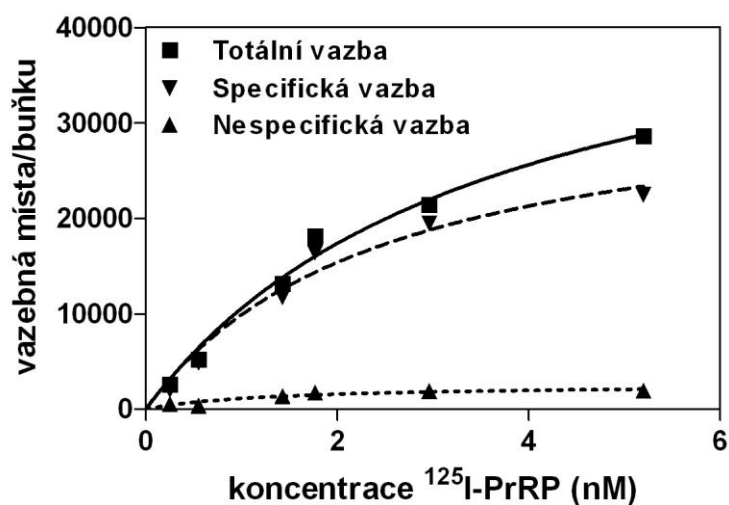
PrRP, jelikož obsahuje receptor GPR10 (viz Obr. 5), ke kterému se PrRP váže s vysokou afinitou v řádu  $10^{-9}$  mol/l, což dokazují saturační vazebné experimenty provedené na RC-4B/C s radioaktivně značeným PrRP31 (viz Obr. 6) [54]. PrRP13, u kterého Boyle a kol. stanovili afinitu k buňkám s transfektovaným receptorem GPR10 srovnatelnou s PrRP31 či PrRP20, měl při experimentech prováděných Maixnerovou a kol. na buňkách RC-4B/C afinitu pouze v řádu  $10^{-7}$  mol/l [54]. Zároveň bylo prokázáno, že po působení PrRP31 a PrRP20 dochází ke spuštění cytozolické signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 (mitogenem aktivovaná proteinkináza/extracelulárním signálem regulována kináza 1/2) i jaderné signalizační dráhy CREB (*cAMP response element binding*) [54]. Signalizační dráha MAPK/ERK1/2 je důležitá pro spuštění aktivace translace genu pro PRL [59]. Je možné, že aktivace translace je závislá i na fosforylaci CREB, který je fosforylován pomocí cytozolické signalizační dráhy Akt [60]. Dimer fosforylovaného CREB je schopen se vázat na promotor určitého genu a zahájit translaci a tím i transkripci [61].



**Obr. 5 Prokázání přítomnosti receptoru GPR10 v potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C [54]**

*Dokazování přítomnosti receptoru bylo provedeno pomocí metody Western blot s detekcí pomocí specifické protilátky. Jako pozitivní kontrola byly využity Jurkat buňky.*

## RC-4B/C



**Obr. 6** Graf saturačních vazebných experimentů na potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C [54]

Totální vazba udává množství radioligandu navázané na buňku bez přítomnosti kompetitoru, specifická vazba je vazba radioligandu na receptor, který je předmětem našeho zájmu (tedy GPR10) a nespecifická vazba je vazba radioligandu na ostatní místa na buňce.

### 2.3.2 GH3

GH3 je epiteliální buněčná linie získaná z potkaního adenohypofyzárního tumoru. Obsahuje laktotropy a somatotypy [62]. Bylo prokázáno, že PrRP zde také aktivuje signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 [59]. U této buněčné linie PrRP spouští i signalizační dráhu CREB [60].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Aminokyseliny	Iris Biotech, Marktredwitz, Německo
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bromfenolová modř	Fluka, Buchs, Švýcarsko
DMEM – <i>high glucose</i> (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Duracrol	Spofa – Dental, ČR
Epidermální růstový faktor (EGF)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fetální hovězí sérum (FBS) Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
D-glukosa bezvodá	PENTA, Chrudim, ČR
L-glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Glycerin bezvodý	PENTA, Chrudim, ČR
Glycin	PENTA, Chrudim, ČR
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí pankreatický inhibitor proteáz (BPTI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
KCl	Sigma, St. Louis, MO, USA
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Methanol	PENTA, Chrudim, ČR
MgCl <sub>2</sub> hexahydrát	LACHEMA, Brno, ČR
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaCl	LACHEMA, Brno, ČR

---

NaF	PENTA, Chrudim, ČR
Na <sup>125</sup> I	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NaOH	PETNA, Chrudim, ČR
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Persíran amonný	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Polyethylenimin (PEI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trizma base Primary Standard and Buffer	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB

### 3.1.2 Protilátky

CREB (86B10) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo-p44/42MAPK(Thr202/Tyr204) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
P44/42 MAPK (ERK1/2) (3A7) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí mAb proti myší IgG značená peroxidázou	Sigma, St. Louis, MO, USA

### 3.1.3 Přístroje

- Biohazardní box (EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí)
- CCD kamera LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Německo)
- Centrifuga HETTICH Univerzal 320, Tuttlingen, Německo
- Centrifuga Jouan C3i/CR 3 (Jouan, Saint-Herblain, Francie)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko)
- γ-čítač (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)
- Mikroskop Stand Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Německo

### 3.1.4 Peptidy

Peptidy byly syntetizovány metodou syntézy na pevné fázi na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, na oddělení peptidové syntézy dle postupu Maixnerové a kol. [63]. Syntetizován byl PrRP20 (Obr. 7A), který se přirozeně vyskytuje v organismu, a 8 nových analogů PrRP20, u nichž byl C-koncový fenylalanin v pozici 31 vyměněn za různé deriváty fenylalaninu (nekódové aminokyseliny) či tyrosin. Jejich struktura je uvedena na obrázku (Obr. 7B). Dále byl připraven i devátý analog, kterému C-koncový fenylalanin chyběl, avšak C-koncový amid byl zachován.


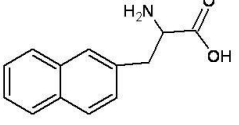
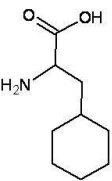
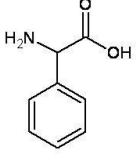
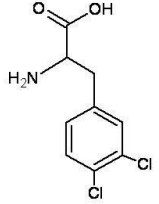
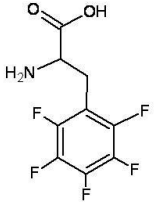
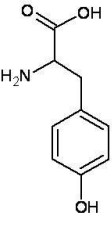
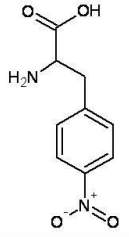
Všechny nové analogy byly acetylovány na N-konci peptidu.

Molární hmotnost peptidů byla ověřena na MALDI-TOF Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

A)



B)

1. 	2. 	3. 	4. 
1-naftylalanin	2-naftylalanin	cyklohexylalanin	fenylglycin
5. 	6. 	7. 	8. 
(3,4-dichlor)fenylalanin	(pentafluor)fenylalanin	tyrosin	(4-nitro)fenylalanin

**Obr. 7 A) Sekvence PrRP20**

Červeně je označen C-koncový fenylalanin v pozici 31, který byl měněn za různé aminokyseliny.

**B) Struktura aminokyselin, které byly použity místo C-koncového fenylalaninu v pozici 31**

### 3.1.4.1 Jodace peptidů

Peptid PrRP31 byl jodován v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Praha pomocí  $\text{Na}^{125}\text{I}$  s činidlem Iodo-Gen v 0,1 mol/l fosfátovém pufru s pH 7,2. Jodace probíhala 15 minut při laboratorní teplotě. Monojodovaný a dijojovaný PrRP31 byly separovány pomocí RP-HPLC na koloně Agilent Prep-C18 Scalar 5 $\mu\text{m}$ , 250x4,6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) v 20-30% gradientu acetonitrilu ve vodě s 0,05% kyselinou trifluoroctovou. Monojodovaný peptid byl uchován v alikvotech při -20°C a byl spotřebován při vazebných studiích v průběhu jednoho měsíce.

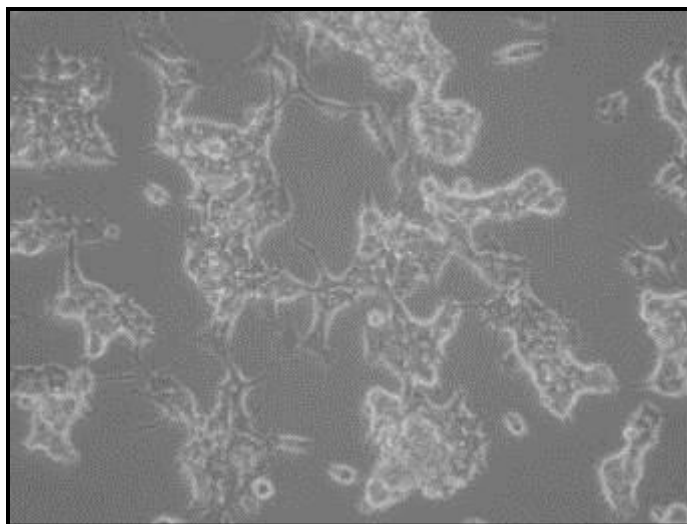
## 3.2 POKUSY *IN VITRO*

### 3.2.1 Pěstování buněčné hypofyzární linie RC-4B/C

Hypofyzární potkaní buněčná linie byla pěstována v inkubátoru při 37°C v atmosféře 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s přidaným 10% tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FBS), 2% glutaminem a 1% penicilin/streptomycinem. Do média bylo dále přidáváno 2,5  $\mu\text{g/ml}$  epidermálního růstového faktoru (EGF).

Po 3-4 dnech, v závislosti na počtu buněk, bylo prováděno pasážování. Typické tvary buněk hypofyzární buněčné linie RC-4B/C jsou na obrázku (Obr. 8).

Buňky, které byly využity na kompetitivní vazebné experimenty a stanovení PRL v médiu byly pěstovány na 24-jamkových destičkách (Nuclon<sup>TM</sup>, NUNC, Roskilde, Dánsko). Buňky využité na prokázání buněčné signalizace byly pěstovány na 6-jamkových destičkách (Lennox Laboratory Supplies Ltd., IWAKI, Dublin, Irsko). Dna destiček byla potažena polyethyleniminem (PEI), který zajistil větší přilnavost buněk ke dnu a odolnost při provádění pokusu.



**Obr. 8 Typické tvary buněk hypofyzární buněčné linie RC-4B/C**

*Buňky byly fotografovány po 48 hodinách růstu v kultivační lahvi s růstovým médiem se zvětšením 40x..*

### 3.2.2 Kompetitivní vazebné experimenty

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny podle principů Motulského a Neubiga [64]. Optimální podmínky pro provedení kompetitivních vazebných experimentů byly zjišťovány v mé bakalářské práci [65].

Pro vazebné pokusy se buněčná linie pěstovala na 24-jamkových destičkách, jejichž dno bylo potaženo PEI. Buňky byly pěstovány do optimálního počtu 300-450 tisíc buněk/jamku.

Nejprve byla každá jamka promyta promývacím pufr (10 mmol/l HEPES pH 7,4, 118 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ), který byl vytemperován na laboratorní teplotu. Do každé jamky byl pipetován vazebný pufr (20 mmol/l HEPES pH 7,4, 118 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 5,5 mmol/l glukosa, 1 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml BPTI), neznačený peptid PrRP20 či analog PrRP20 s finální koncentrací v rozmezí  $10^{-11}$  až  $10^{-4}$  mol/l a  $^{125}\text{I}$ -PrRP31 s finální koncentrací  $10^{-10}$  mol/l. Pro stanovení totální vazby byl do jamky místo neznačeného peptidu přidán vazebný pufr. Destička pak byla inkubována 90 min při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byla každá jamka opět promyta promývacím pufr a následně byly buňky solubilizovány v 0,1 mol/l roztoku NaOH po dobu 15 minut. Lyzáty buněk pak byly odebrány do plastových zkumavek a radioaktivita navázaná na buňkách byla proměřena na  $\gamma$ -čítači.

Pokusy byly vždy prováděny v duplikátech a alespoň třikrát opakovány.

### 3.2.3 Buněčná signalizace

#### 3.2.3.1 Sběr vzorků

Buňky, které byly využity k prokázání, zda analogy PrRP20 spouští signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 či CREB, byly pěstovány na 6-jamkových destičkách, které měly průměr jamky 33 mm a jejichž dno bylo také potaženo PEI. Buňky byly pěstovány do optimální hustoty 700-900 tisíc buněk/jamku.

17 hodin před sběrem vzorků bylo vyměněno růstové médium za médium bez séra a bez EGF. Do každé jamky byl přidán příslušný analog PrRP20 v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  mol/l. Do jamky, ze které byla sbírána kontrola, nebyl přidán žádný peptid. Po 5ti minutové inkubaci při 37°C byla destička dána na led a každá jamka byla třikrát propláchnuta pufrem PBS s pH 7,4 (137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 8 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,76 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), který byl vytemperován na 4°C. Buňky pak byly solubilizovány ve vzorkovém pufru (62,5 mmol/l Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol, 50 mmol/l NaF a 1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), odebrány do mikrozkušavek a zamrazeny v -20°C.

Vzorky byly sbírány alespoň ve třech nezávislých pokusech.

#### 3.2.3.2 Western blot

K prokazování, zda analogy PrRP20 spouští signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 či CREB, byla využita metoda Western blotu.

##### 3.2.3.2.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS

Elektroforéza byla prováděna na 5%/12% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Vzorky, které byly na gely nanášeny, byly 1 minutu sonikovány, poté 2 minuty zahřívány při 100°C a nakonec centrifugovány 5 minut při  $500 \times g$  při laboratorní teplotě. Jako pozitivní kontrola byl využit PrRP20, u kterého bylo prokázáno, že spouští signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 a CREB [54]. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 100 V 10 minut a asi 60 minut při napětí 150 V.

### 3.2.3.2.2 *Přenos proteinů na PVDF membránu*

Pro prokázání přítomnosti fosforylovaných proteinů ve vzorcích byly proteiny z SDS-PAGE gelu přeneseny na membránu Immobilon™-P PVDF (polyvinyliden difluorid) (Sigma-Aldrich, USA). Přenos probíhal v blotovacím pufru s pH 8,3 (25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycín a 20% methanol) po dobu 20 hodin při 4°C za konstantního napětí 30 V.

### 3.2.3.2.3 *Detekce proteinů na PVDF membráně*

Po přenesení proteinů na PVDF membránu byly membrány 5 minut promývány v promývacím TBS pufru (20 mmol/l Tris, 140 mmol/l NaCl a 0,1% Tween-20) a poté byly jednu hodinu inkubovány v blokovacím pufru (5% odtučněné sušené mléko, 20 mmol/l Tris, 140 mmol/l NaCl, 0,1% Tween-20, 5 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 50 mmol/l NaF) při laboratorní teplotě. Následně byly membrány třikrát promyty promývacím TBS pufrem po dobu 5 minut. Dále byly membrány jednu hodinu inkubovány s primární protilátkou, která byla ředěna v blokovacím pufru. Seznam primárních protilátek s příslušným ředěním je uveden v tabulce (Tab. 1).

Po opětovném trojím promytí membrán promývacím TBS pufrem po dobu 5 minut byly membrány jednu hodinu inkubovány s králičí sekundární protilátkou značenou peroxidázou, která byla ředěna v blokovacím pufru v poměru 1:12 000.

Poté byly membrány opět třikrát promyty v promývacím TBS pufru po dobu 5 minut a následně na ně byl aplikován roztok Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), který způsobil chemiluminiscenci, která byla detekována pomocí CCD kamery LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Německo).

**Tab. 1** *Přehled primárních mAb používaných při detekci proteinů na PVDF membránách*

*Protilátky byly ředěny v blokovacím pufru (složení viz kapitola 3.2.3.2.3).*

<b>Protilátka</b>	<b>Ředění</b>
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAb	1:2 000
p44/42 MAPK (ERK1/2) (3A7) myší mAb	1:2 000
Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb	1:1 000
CREB (86B10) myší mAb	1:1 000

### 3.2.4 Stanovení prolaktinu v médiu hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

#### 3.2.4.1 Sběr vzorků

Buňky, které byly využity pro stanovení uvolňování PRL, byly pěstovány na 24-jamkových destičkách, které měly dno potažené PEI. Buňky byly pěstovány do optimálního počtu 300-400 tisíc buněk/jamku.

Dvě hodiny před začátkem pokusu bylo vyměněno růstové médium pro RC-4B/C (kapitola 3.2.1) za médium bez séra a bez EGF. Poté byl pipetován příslušný analog PrRP20 v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-10}$  až  $10^{-4}$  mol/l, vždy v duplikátu. Inkubace probíhala jednu hodinu při 37°C. Na buňky, které byly využity jako kontrola, nebyl aplikován žádný peptid.

Po inkubaci bylo médium odebráno do mikrozkušavek a centrifugováno při  $500 \times g$  po dobu 5 minut při 4°C. Supernatant byl odebrán do mikrozkušavek, které byly zamrazeny při -20°C.

#### 3.2.4.2 Stanovení prolaktinu

Stanovení PRL bylo provedeno pomocí potkaního RIA kitu pro prolaktin (Izotop, Budapešť, Maďarsko), dle přiloženého pracovního návodu. Vzorky média byly na základě předchozích výsledků 400× zředěny v PBS pufru (kapitola 3.2.3.1).

### 3.2.5 Vyhodnocení *in vitro* experimentů

Pro vyhodnocení kompetitivních vazebných experimentů a experimentů zkoumajících vliv PrRP na vylučování PRL do média buněčné hypofyzární linie RC-4B/C byl využit program Graph Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Pro vyhodnocení spouštění signálních drah bylo využito denzitometrické stanovení pomocí programu Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA).

Pro kompetitivní vazebné experimenty byla využita metoda nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa. Pomocí kompetitivních vazebných experimentů byla stanovena hodnota inhibiční koncentrace  $IC_{50}$ , což je hodnota, při které se neznačený ligand váže právě na polovinu receptorů v přítomnosti radioligandu. Z této hodnoty je možné vypočítat hodnotu rovnovážné disociační konstanty neznačené látky  $K_i$ , což je koncentrace neznačeného ligandu, která se váže na polovinu receptorů v nepřítomnosti radioligandu či jiných kompetitorů [64].



Hodnotu  $K_i$  je možné vypočítat pomocí rovnice Chenga a Prussofa [66]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}} \text{ [mol/l]}$$

Hodnota  $IC_{50}$  je známa z kompetitivních vazebných experimentů a hodnota rovnovážné disociační konstanty  $K_d$  ze saturačních vazebných experimentů, které byly provedeny za podobných podmínek jako kompetitivní vazebné experimenty [64]. Hodnota  $K_d$  se rovnala 4,21 nmol/l a koncentrace radioligandu byla 0,1 nmol/l [54].

Pro statistické vyhodnocení statisticky významné odpovědi u buněčné signalizace byla využita metoda one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. Data byla statisticky významná, když  $P < 0,05$ .

Pro vyhodnocení stanovení uvolňování PRL byla využita metoda nelineární regrese. Díky ní byla stanovena hodnota  $EC_{50}$ , což je taková koncentrace agonisty, která způsobí 50 % maximálního možného efektu.

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru) a jsou stanovena alespoň ze tří nezávislých měření v duplikátu.

### 3.3 POKUSY *IN VIVO*

#### 3.3.1 Experimentální zvířata

Myši samci kmene C57Bl/6 byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů akademie věd v Krči při teplotě  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  a měli volný přístup k potravě i k pití. Rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin (začátek světla 6:00). Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.). Samci byli krmeni standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3,4 kcal/g.

#### 3.3.2 Test příjmu potravy po podání analogů PrRP

##### 3.3.2.1 Zavedení kanyly do třetí mozkové komory

Tato metoda byla provedena podle postupů Maixnerové a kol. [54]. Operace byla prováděna ve věku 2-3 měsíců. Během ní byly myši v celkové anestezii (intraperitoneální (IP) injekce ketamin/xylazin: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg

xylazinu, Spofa, ČR). K fixaci hlavy byl použit stereotaxický přístroj a kanyla (Plastic One, Roanoke, VA, USA) byla zavedena do 3. mozkové komory (2 mm od bregmy v *anterior posteriori* směru, ve vertikálním směru pak 3 mm). Okolo kanyly byla aplikována dentální pryskyřice (Spofa-Dental, ČR) rozpuštěná v duracrolu (Spofa-Dental, ČR). Aby nedošlo k ucpání kanyly, byla do ní po ztvrdnutí pryskyřice vsunuta vnitřní kanyla. Myši samec kmene C57Bl/6 se zavedenou kanylou je zobrazen na obrázku (Obr. 9).

Myši byly ponechány v individuálních klíčkách v klidu asi 3-4 dny po operaci.



**Obr. 9** Myši samec kmene C57Bl/6 s kanylou zavedenou do 3. mozkové komory

### 3.3.2.2 Sledování příjmu potravy

Pokus, při kterém bylo sledováno ovlivnění příjmu potravy po podání analogů PrRP20, byl prováděn minimálně tři dny po zavedení kanyly.

17 hodin před injektováním peptidu byla myším odebrána potrava, ale zůstal volný přístup k pití. Injektování fyziologického roztoku, PrRP20 a analogů PrRP20, které byly rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, bylo prováděno pomocí infuzní pumpy a jednotlivá dávka peptidu činila 1, 4 či 10 nmol/myš (5  $\mu$ l/myš).

15 minut po injektování peptidu byla myším podána předem zvážená potrava. Potrava pak byla vážena každých 30 minut po dobu 5 hodin.

Podání každé dávky analogu PrRP bylo prováděno alespoň dvakrát a jedna skupina myši čítala minimálně 6 jedinců.

Po skončení pokusu byly odebrány mozky myši ke kontrole, zda byla kanyla zavedena opravdu do třetí mozkové komory. Mozky byly krájeny na kryomikrotomu a řezy o tloušťce 20–30  $\mu$ m byly barveny kresylovou violetí.

### **3.3.3 Statistické vyhodnocení *in vivo* experimentů**

Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Pro statistické vyhodnocení byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), metoda one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. Rozdíly v příjmu potravy mezi jedinci, jimž byl injektován fyziologický roztok, a jedinci, kterým byl injektován daný peptid, byly považovány za statisticky významné, pokud  $P < 0,05$ .

## 4 VÝSLEDKY

---

### 4.1 POKUSY *IN VITRO*

#### 4.1.1 Peptidy

Molární hmotnost syntetizovaných analogů PrRP20 byla ověřena na hmotnostním spektrofotometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Bylo prokázáno, že molární hmotnost peptidů se shoduje s teoretickou molární hmotností, a že jejich čistota je vyšší než 95 %.

##### 4.1.1.1 Jodace peptidů

PrRP31 byl značen radioaktivním izotopem jódu  $^{125}\text{I}$  na tyrosinu v pozici 20. Pro oddělení monojodovaného PrRP31, který se využívá při kompetitivních vazebných experimentech, od nezreagovaného a dijodovaného peptidu, byla využita RP-HPLC. Výtěžek monojodovaného  $^{125}\text{I}$ -PrRP31 činil 20-30 %.

#### 4.1.2 Pěstování hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

Hypofyzární buněčná linie RC-4B/C byla pěstována ve sterilním prostředí při 37°C v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  v růstovém médiu (kapitola 3.2.1). Buňky dobře přisedaly na destičky potažené PEI, které zajistilo homogenní rozložení buněk na dně jamky a vyšší odolnost buněk při pokusu. Kompetitivní vazebné pokusy a stanovení PRL v médiu byly prováděny na 24-jamkových destičkách, zatímco buňky, u kterých byla prokazována signalizace MAPK/ERK1/2 a CREB, byly pěstovány na 6-jamkových destičkách.

#### 4.1.3 Kompetitivní vazebné experimenty

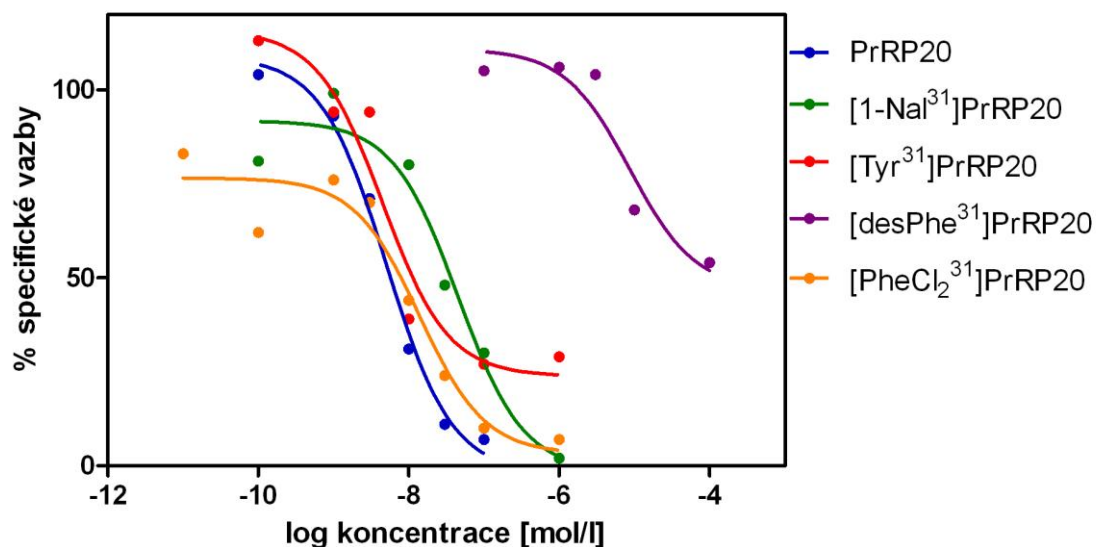
Optimalizace podmínek pro správné provedení kompetitivního vazebného experimentu byla prováděna již dříve. Zjištěné optimální podmínky, při kterých nespecifická vazba byla menší než 50 % z totální vazby [64], byly zachovány při všech pokusech a jsou to: 300-450 tisíc buněk/jamku a inkubace 90 min při laboratorní teplotě ve vazebném pufru obsahujícím 0,1 mg/ml BPTI.

Totální vazba tvořila asi 10 % z celkové radioaktivity použité při experimentu. Nespecifická vazba byla asi 5 % z totální vazby.

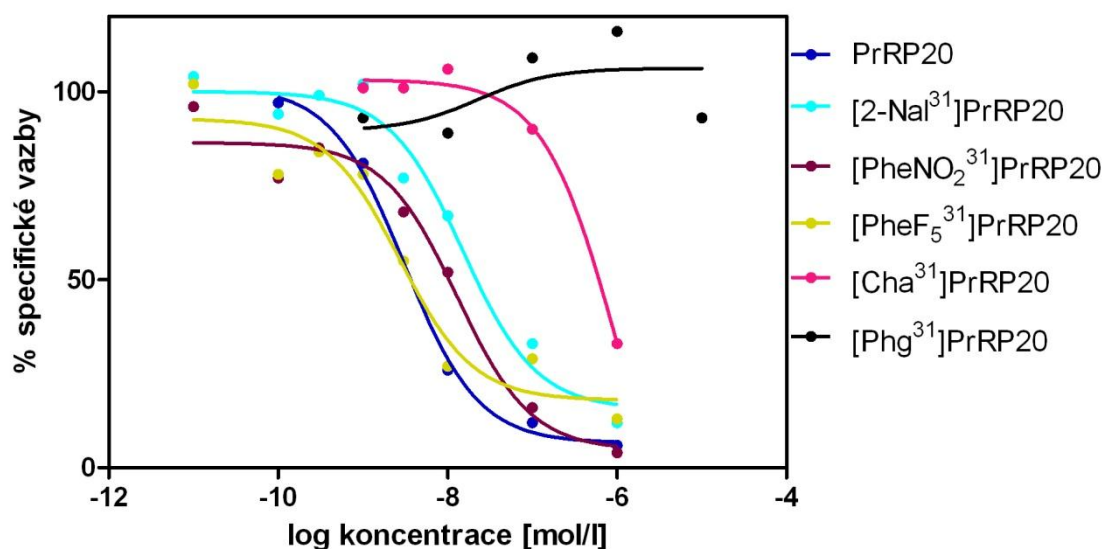
Hodnoty inhibiční konstanty neznačené látky  $K_i$ , vypočítané dosazením  $IC_{50}$  do rovnice Chenga a Prusoffa [66] (za  $K_d$  byla dosazena hodnota 4,21 nmol/l zjištěná při saturačních vazebných experimentech [54] a koncentrace radioligandu byla 0,1 nmol/l) s příslušnými hodnotami S.E.M. pro PrRP20 a jeho analogy jsou uvedeny v tabulce shrnující *in vitro* experimenty (Tab. 2) na str. 46. Grafy s typickými křivkami jednotlivých analogů PrRP jsou uvedeny na obrázku (Obr. 10 A, B).

Hodnoty  $K_i$  pro vazbu na GPR10 receptor se pohybovaly v nízkých koncentracích v řádu  $10^{-9}$  mol/l pro PrRP20, [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20, [PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20 a [PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20. Stále velmi nízkou hodnotu  $K_i$  v řádu  $10^{-8}$  mol/l měly zachovanou analogy [1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20 a [2-Nal<sup>31</sup>]PrRP20.  $K_i$  pro [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 byly v řádu  $10^{-7}$  mol/l, [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 v řádu  $10^{-5}$  mol/l a [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 měl  $K_i$  větší než  $10^{-4}$  mol/l.

A)



B)



**Obr. 10** Grafy znázorňující typické křivky PrRP20 a analogů PrRP20 získané při kompetitivních vazebných experimentech

Kompetitivní vazebné pokusy probíhaly při 90 min inkubaci při laboratorní teplotě ve vazebném pufru (složení viz kapitola 3.2.2).

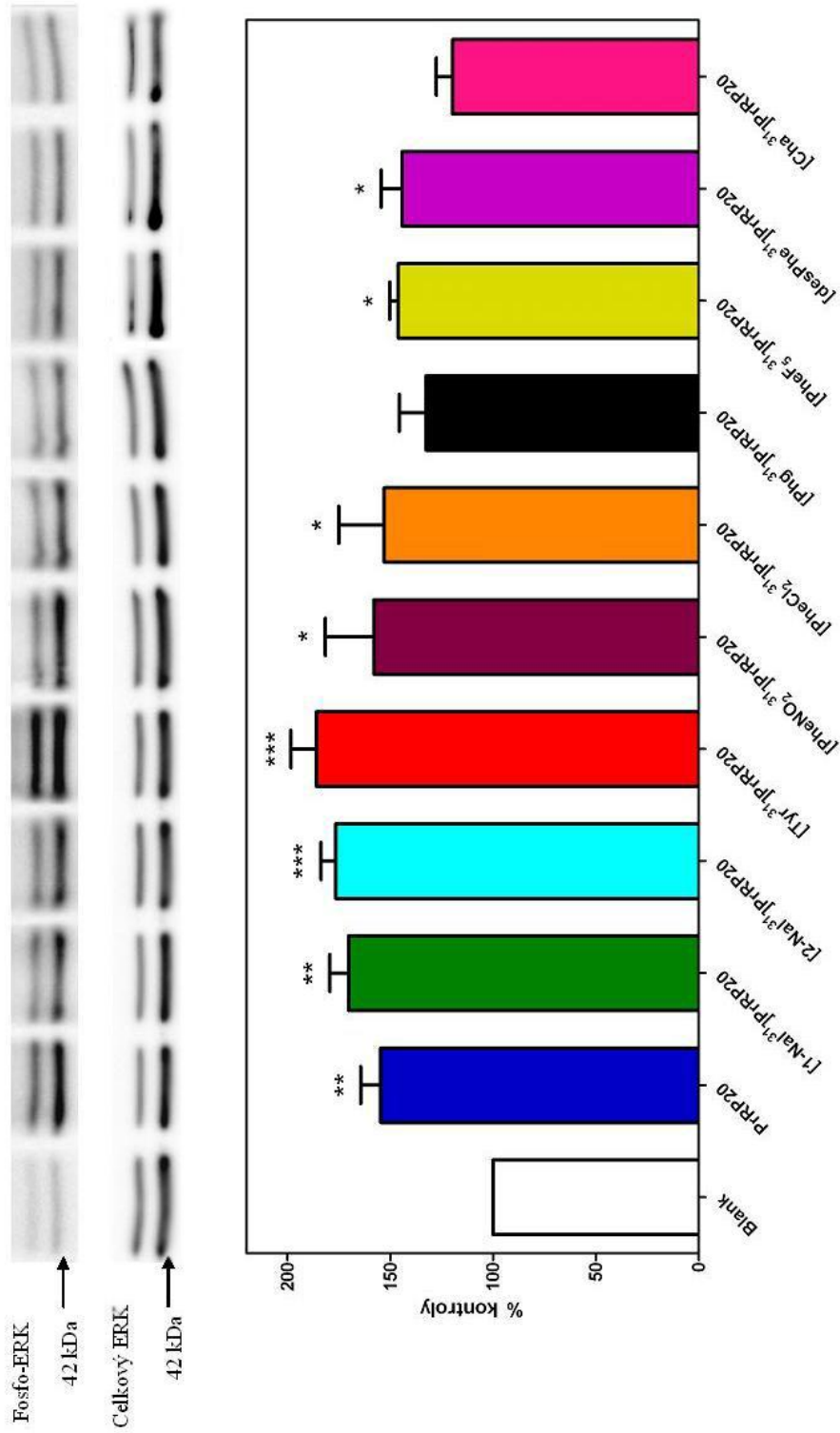
Specifická vazba byla vypočítána odečtením nespecifické vazby (nespecifická vazba za přítomnosti  $10^{-5}$  mol/l analogu PrRP20 a  $10^{-10}$  mol/l  $^{125}$ I-PrRP31) od totální vazby (celková vazba za přítomnosti  $10^{-10}$  mol/l  $^{125}$ I-PrRP31). Je vyjádřena v procentech vzhledem k totální vazbě.

#### **4.1.4 Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB po působení analogů PrRP20 u hypofyzární buněčné linie RC-4B/C**

Pro odběr vzorků na stanovení cytozolické a jaderné signalizace byla hypofyzární buněčná linie RC-4B/C pěstována na 6-jamkových destičkách za optimálních podmínek, které jsou uvedeny výše (kap. 3.2.1). Jako pozitivní kontrola byl využit PrRP20, u kterého bylo prokázáno, že spouští fosforylaci MAPK/ERK1/2 i CREB [54].

Výsledky ze spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 a CREB po působení analogů PrRP20 jsou shrnuty v Tab. 2 na str. 46.

Jak je patrné z obrázků (Obr. 11, Obr. 12), všechny analogy PrRP20 působí jako agonisté, jelikož všechny spouštěly signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 i CREB. Po působení [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 však nedocházelo k významnému zvýšení fosforylace ani u cytozolické, ani u jaderné signalizace. [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 nezpůsobil zvýšení fosforylace MAPK/ERK1/2, avšak významně zvýšil fosforylaci CREB. Ostatní analogy významně zvýšily fosforylaci proteinů u obou signálních drah.

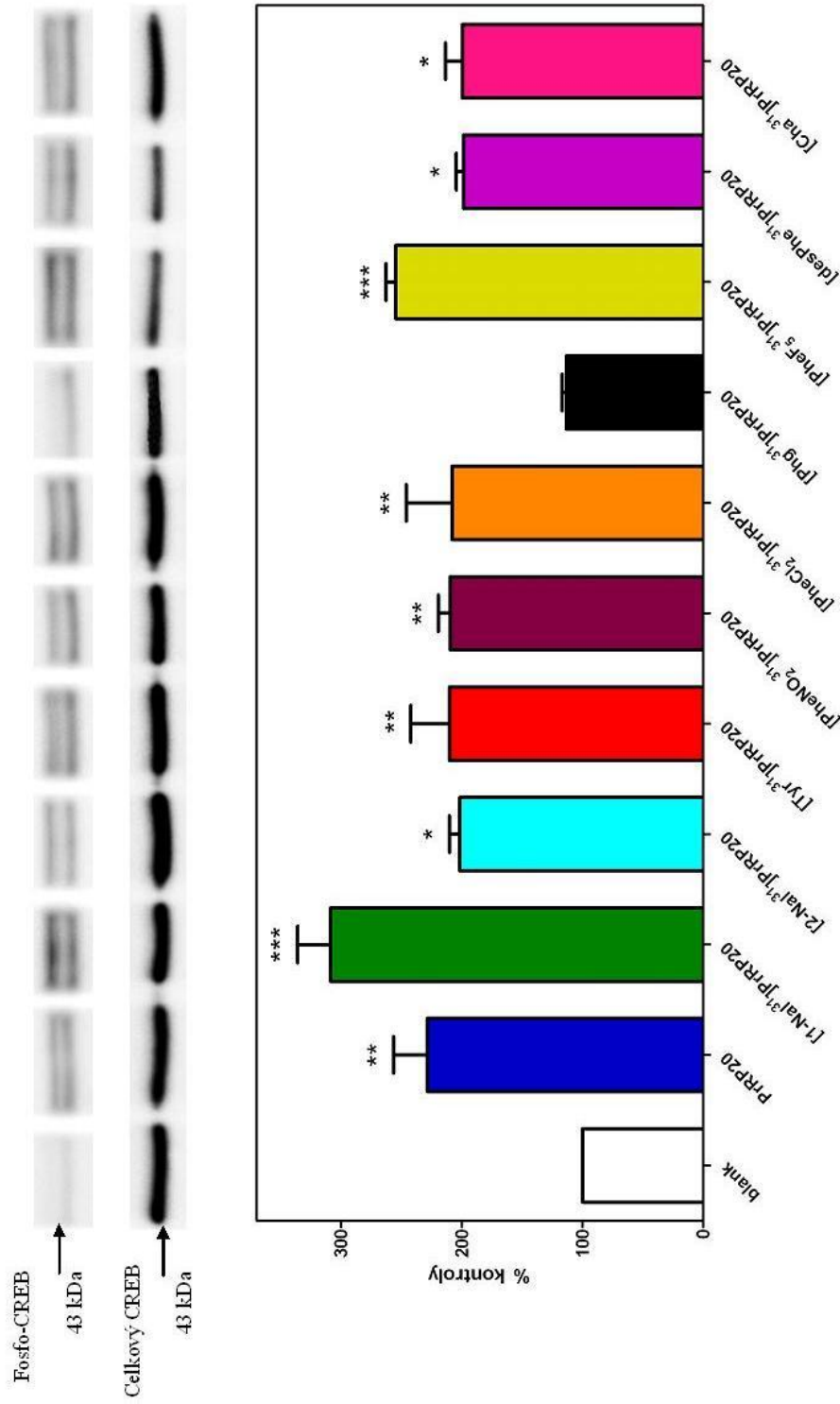


**Obr. 11 Graf znázorňující účinek analogů PrRP20 na spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2**

Buňky RC-4B/C byly stimulovány PrRP20 a jeho analogy ve finální koncentraci  $10^{-5}$  mol/l po dobu 5 min při 37°C.

Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala dle postupu, který je popsán v kapitole 3.2.3.2. Data jsou průměr  $\pm$  S.E.M.  $n = 3$  pokusy. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .





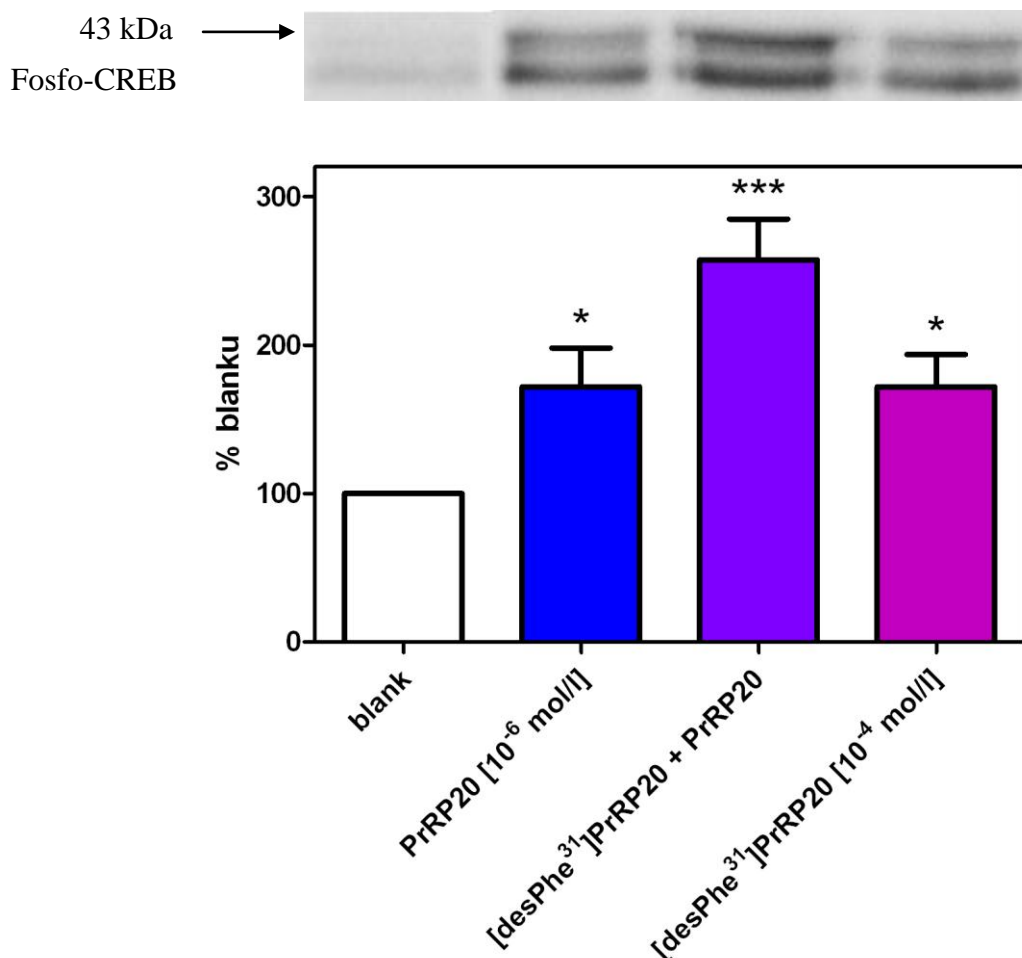
Obr. 12 Graf znázorňující účinek analogů PrRP20 na spouštění signalizace CREB

Buňky RC-4B/C byly stimulovány PrRP20 a jeho analogy ve finální koncentraci  $10^{-5}$  mol/l po dobu 5 min při 37°C.

Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala dle postupu, který je popsán v kapitole 3.2.3.2. Data jsou průměr  $\pm$  S.E.M.  $n = 3$  pokusy. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.1.5 Testování analogu [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 na jeho případné antagonistické působení

Pomocí buněčné signalizace bylo zkoumáno, zda analog [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 nepůsobí jako antagonist PrRP20. Bylo však prokázáno, že po společné aplikaci PrRP20 v koncentraci  $10^{-6}$  mol/l a [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 v koncentraci  $10^{-4}$  mol/l došlo k výraznému zvýšení fosforylace CREB, tudíž že došlo k aditivnímu účinku obou analogů. Bylo tedy prokázáno, že [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 je agonistou receptoru GPR10. Výsledek je patrný z obrázku (Obr. 13).



**Obr. 13 Graf znázorňující účinek společného podání PrRP20 a [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20**

Buňky RC-4B/C byly stimulovány PrRP20 v koncentraci  $10^{-6}$  mol/l a analogem [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 v koncentraci  $10^{-4}$  mol/l při 37°C. Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala dle postupu, který je popsán v kapitole 3.2.3.2. Data jsou průměr  $\pm$  S.E.M.,  $n = 2$  pokusy. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je

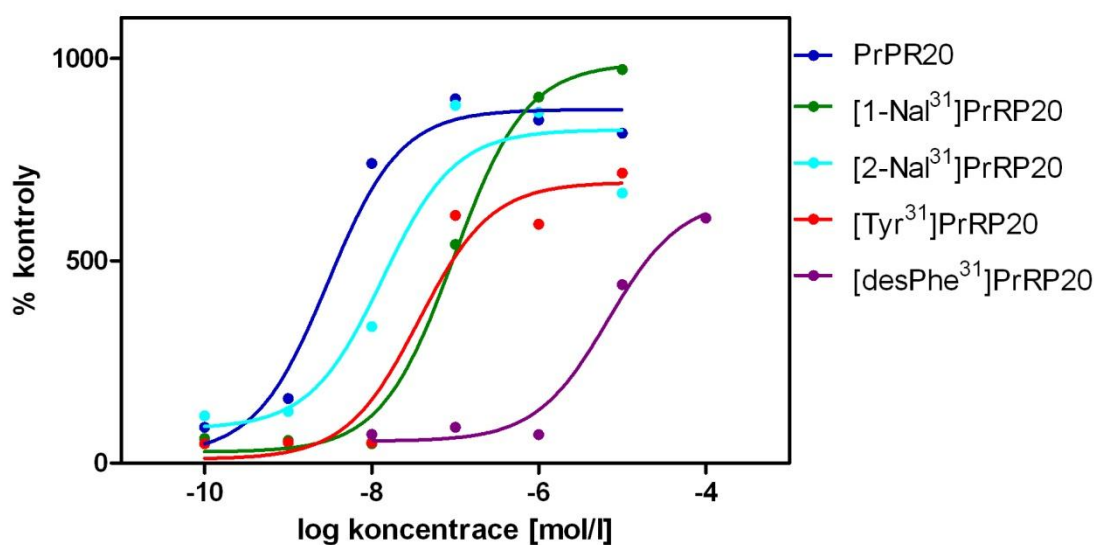
\* $P < 0,05$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.1.6 Stanovení uvolňování prolaktinu v médiu hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

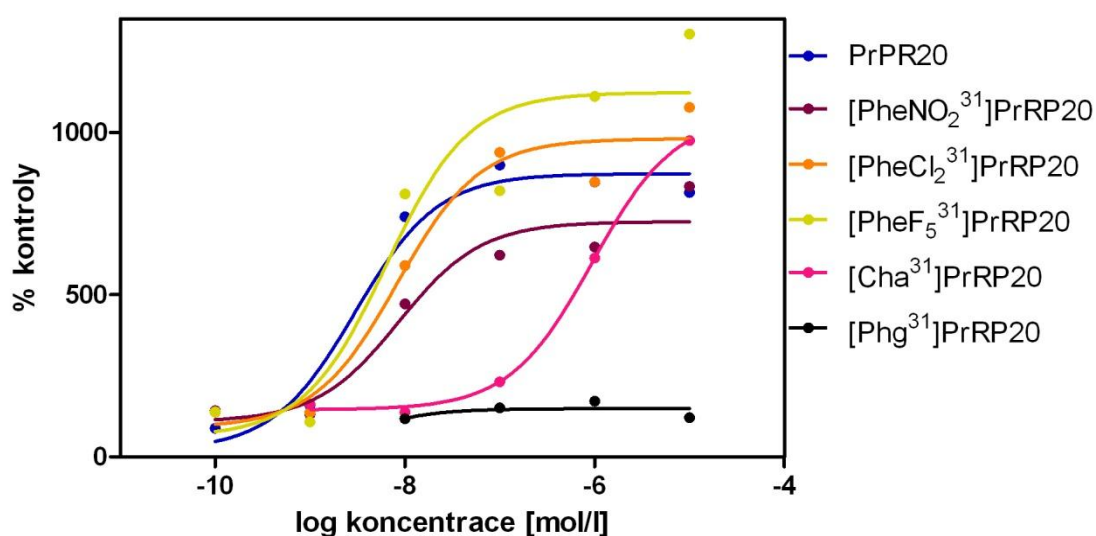
Stanovení uvolňování PRL bylo prováděno jako další funkční test s analogy PrRP20. Buňky byly pěstovány za konstantních podmínek na 24-jamkových destičkách do finálního počtu 300-400 tisíc buněk/jamku. Koncentrace uvolněného PRL byla stanovena pomocí potkaního RIA kitu pro prolaktin (Izotop, Budapešť, Maďarsko) ze vzorků média 400× naředěných v PBS pufru. Hodnoty efektivní koncentrace  $EC_{50}$  s příslušnými hodnotami S.E.M. jsou uvedeny v tabulce shrnující výsledky *in vitro* experimentů (Tab. 2) na str. 46. Na obrázku (Obr. 14) jsou znázorněny křivky typické pro všechny analogy PrRP20. Jako 100 % je brána hodnota kontroly, tedy médium z buněk, na které se nepůsobilo žádným analogem PrRP.

Po působení všech analogů PrRP20 (kromě analogu  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$ ) na buněčnou linii RC-4B/C docházelo ke zvýšení uvolňování PRL.  $EC_{50}$  byla v řádu  $10^{-9}$  mol/l u PrRP20 a analogů  $[\text{PheNO}_2^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[\text{PheCl}_2^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{PheF}_5^{31}]\text{PrRP20}$ . Stále nízkou hodnotu  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-8}$  mol/l měly zachovanou analogy  $[\text{1-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[\text{2-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Tyr}^{31}]\text{PrRP20}$ .  $[\text{Cha}^{31}]\text{PrRP20}$  pak měl  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-7}$  mol/l,  $[\text{desPhe}^{31}]\text{PrRP20}$  v řádu  $10^{-6}$  mol/l a výše zmiňovaný  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$  vyšší než  $10^{-4}$  mol/l.

A)



B)



**Obr. 14** Grafy typických křivek získaných při stanovení uvolňování prolaktinu na buněčné linii RC-4B/C po působení PrRP20 a analogů PrRP20

Na buňky RC-4B/C bylo působeno PrRP20 a jeho analogy po dobu jedné hodiny při 37°C. V supernatantu, tj. médiu, bylo stanoveno množství uvolněného prolaktinu pomocí RIA kitu ke stanovení prolaktinu (Izotop, Budapešť, Maďarsko) dle návodu přiloženého výrobcem.

Jako kontrola je bráno médium, do kterého nebyl přidán žádný peptid.

#### 4.1.7 Shrnutí výsledků *in vitro* experimentů

V následující tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny výsledky všech *in vitro* experimentů provedených na buněčné hypofyzární linii RC-4B/C, které byly popsány v kapitolách výše.

**Tab. 2** Přehled výsledků dosažených působením analogů PrRP20 na hypofyzární buněčnou linii RC-4B/C

Analog	Kompetitivní vazebné experimenty	Signalizační dráhy		Uvolňování prolaktinu
	$K_i$ [mol/l]	ERK	CREB	$EC_{50}$ [mol/l]
<b>PrRP20</b>	$(5,22 \pm 0,96) \times 10^{-9}$	agonista	agonista	$(3,61 \pm 0,53) \times 10^{-9}$
<b>[1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(4,82 \pm 1,43) \times 10^{-8}$	agonista	agonista	$(9,21 \pm 0,47) \times 10^{-8}$
<b>[2-Nal<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(1,90 \pm 0,98) \times 10^{-8}$	agonista	agonista	$(1,52 \pm 0,12) \times 10^{-8}$
<b>[Tyr<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(5,12 \pm 0,39) \times 10^{-9}$	agonista	agonista	$(2,38 \pm 0,70) \times 10^{-8}$
<b>[PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(1,47 \pm 0,46) \times 10^{-8}$	agonista	agonista	$(7,83 \pm 2,22) \times 10^{-9}$
<b>[PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(2,96 \pm 0,98) \times 10^{-9}$	agonista	agonista	$(5,69 \pm 1,25) \times 10^{-9}$
<b>[PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(3,83 \pm 0,75) \times 10^{-9}$	agonista	agonista	$(4,20 \pm 1,73) \times 10^{-9}$
<b>[desPhe<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(1,23 \pm 0,28) \times 10^{-5}$	agonista	agonista	$(6,56 \pm 0,57) \times 10^{-6}$
<b>[Cha<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$(1,14 \pm 0,17) \times 10^{-6}$	bez účinku	agonista	$(6,48 \pm 1,84) \times 10^{-7}$
<b>[Phg<sup>31</sup>]PrRP20</b>	$> 10^{-4}$	bez účinku	bez účinku	$> 10^{-4}$

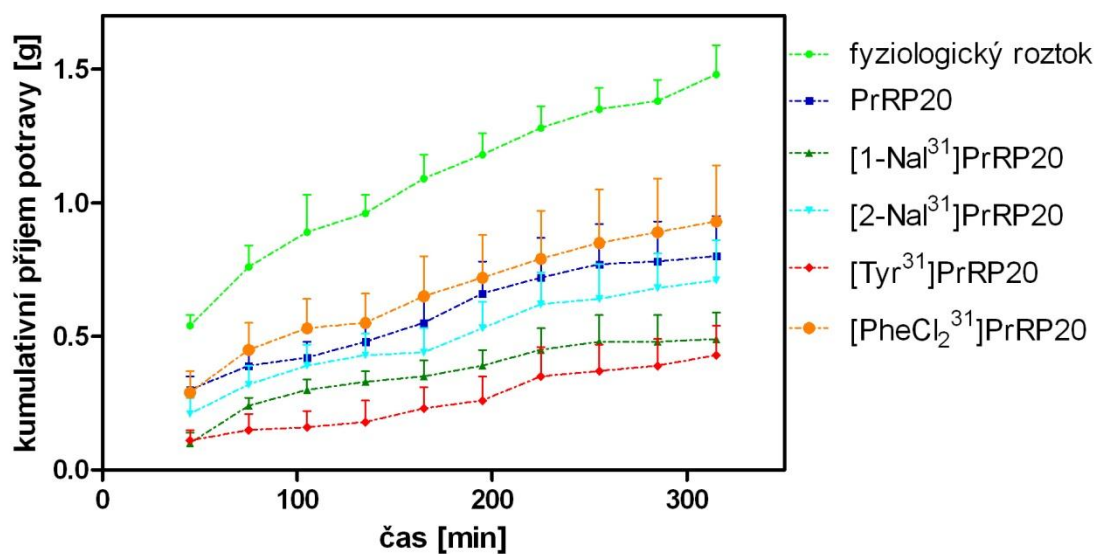
## 4.2 POKUSY *IN VIVO*

### 4.2.1 Ovlivnění příjmu potravy po ICV podání analogů PrRP

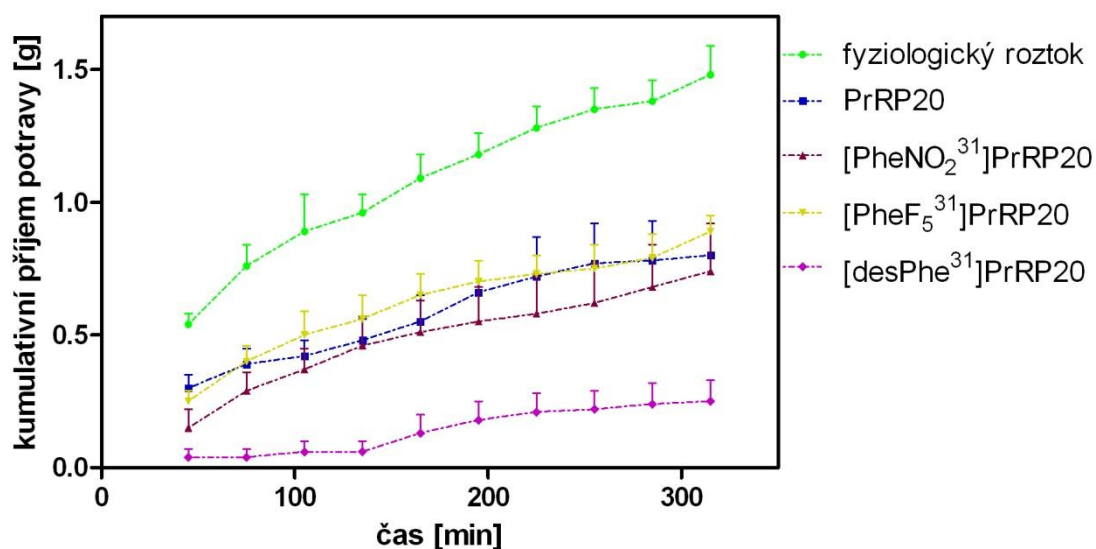
Ovlivnění příjmu potravy bylo sledováno u hladových myších samců kmene C57Bl/6, kterým byla do 3. mozkové komory zavedena kanyla. Kumulativní příjem potravy byl sledován celkem 5 hodin po aplikaci jednotlivých analogů PrRP20. Jako kontrola sloužili jedinci, kterým byl místo analogu PrRP20 injektován fyziologický roztok. Skupina pro jeden analog čítala nejméně 6 myších samců a každý analog v dávce 10 nmol/myš byl testován nejméně dvakrát. Výsledky kumulativního příjmu potravy jsou uvedeny na obrázku (Obr. 15).

Příjem potravy nebyl ovlivněn po podání analogů  $[\text{Cha}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$ . Po aplikaci všech ostatních analogů PrRP20 docházelo ke statisticky významnému snížení příjmu potravy.

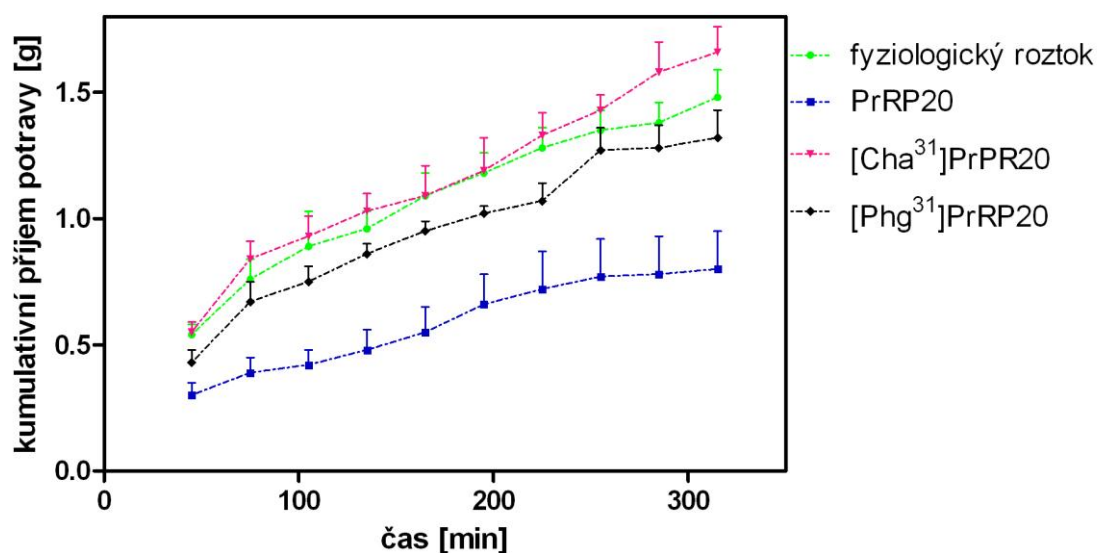
A)



B)



C)



**Obr. 15 Grafy kumulativního příjmu potravy po podání PrRP20 a analogů PrRP20**

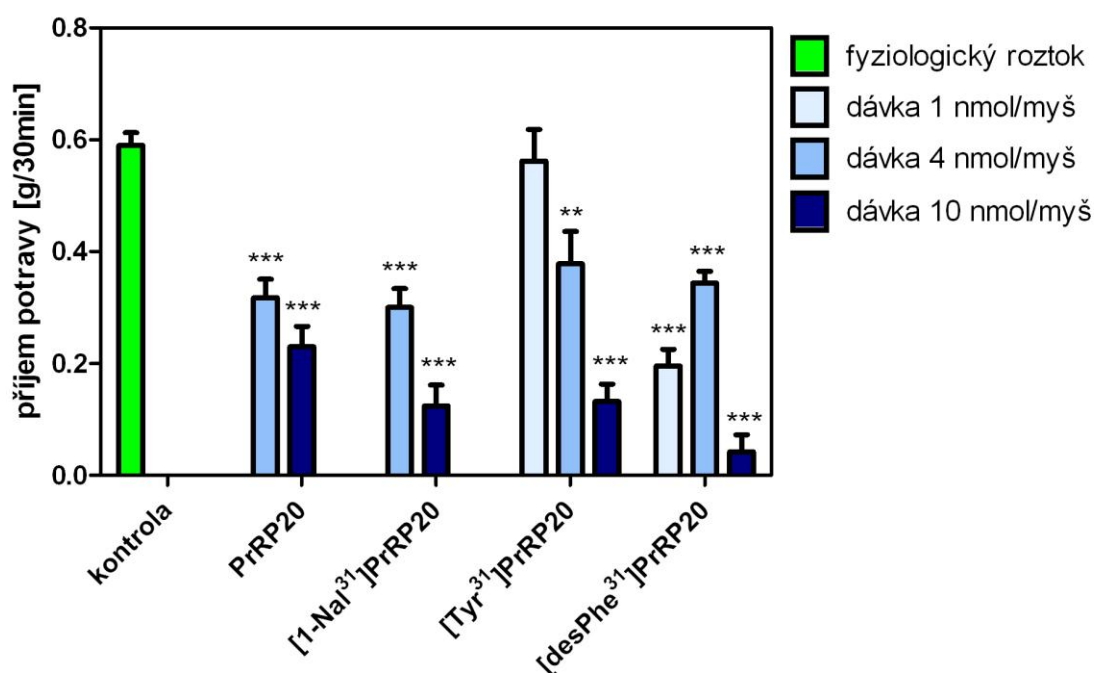
Peptidy byly podávány do třetí mozkové komory v koncentraci 10 nmol/myš (v 5  $\mu$ l/myš).  $n = 6-9$  jedinců na skupinu. Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem.

Signifikance je  $P < 0,001$  u PrRP20, [PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20, [2-Nal<sup>31</sup>]PrRP20, [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20, [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20.

#### 4.2.1.1 Ovlivnění příjmu potravy při různé dávce analogů PrRP20

Závislost účinku na dávce byla zjišťována u analogů  $[1\text{-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[\text{desPhe}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Tyr}^{31}]\text{PrRP20}$ . Kumulativní příjem potravy byl taktéž sledován po dobu 5 hodin po ICV podání analogů PrRP20 v dávce 1, 4 a 10 nmol (injekce  $5\mu\text{l}/\text{myš}$ ).

Všechny analogy významně snižovaly příjem potravy v závislosti na dávce látky a to již při dávce 4 nmol,  $[\text{desPhe}^{31}]\text{PrRP20}$  již při dávce 1 nmol. Výsledky v čase maximálního účinku, tj. 45 min po injekci, jsou patrné z obrázku (Obr. 16).



**Obr. 16** Graf závislosti účinku vybraných analogů PrRP20 na dávce v čase 45 min po podání látky

Peptidy byly podávány v koncentraci 1, 4 a 10 nmol/myš (v  $5\mu\text{l}/\text{myš}$ ).  $n = 6\text{-}9$  jedinců na skupinu. Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. Signifikance je \*\*  $P < 0,01$  a \*\*\*  $P < 0,001$



## 5 DISKUZE

---

Regulace příjmu potravy a regulace energetické rovnováhy jsou složité děje, které jsou ovlivňovány signály tvořícími se v periférii (hlavně v GIT) i v CNS. Tyto signály spolu navzájem interagují. Nejdůležitější oblastí v CNS zajišťující regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy je hypotalamus, který zpracovává signály z periferie i z CNS a následně vysílá signály do dalších oblastí CNS, ze kterých jsou vylučovány anorexigenní či orexigenní faktory. Těchto složitých procesů se účastní mnoho neuropřenašečů a hormonů, jejichž významnou část tvoří látky peptidové povahy. V posledních 15 letech bylo objeveno velké množství peptidů, které se podílí na regulaci příjmu potravy. Často působí i paralelně vedle sebe a jejich přesná funkce není dosud plně objasněna [2, 5].

Jedním z těchto peptidů je i peptid uvolňující prolaktin objevený v roce 1998. Jeho první zjištěnou funkcí bylo zvýšení uvolňování prolaktinu [8], avšak tato funkce byla brzy zpochybněna [15, 25, 27]. Jelikož není znám antagonist PrRP, nebyla doposud objasněna hlavní fyziologická funkce peptidu v organismu, ani mechanismus účinku tohoto peptidu. Díky hojnému výskytu mRNA pro PrRP v hypothalamických jádrech, které se účastní řízení energetické rovnováhy, byly prováděny výzkumy zjišťující účinek PrRP na příjem potravy [28]. V mnoha studiích pak byl potvrzen anorexigenní účinek tohoto peptidu [42, 45, 53].

Tato práce se zabývala účinkem analogů PrRP20 jak při *in vitro* experimentech na potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, tak při *in vivo* experimentech na myších samcích kmene C57Bl/6. Nalezení agonisty PrRP20 selektivně působícího na snížení příjmu potravy, či antagonisty PrRP20 by mohlo v budoucnu vést k objasnění hlavní fyziologické funkce PrRP v organismu a potenciálně i k získání účinného antiobezitního léku.

### 5.1 NOVÉ ANALOGY PrRP

Analogy byly připraveny modifikací C-koncového fenylalaninu v pozici 31 na peptidovém řetězci PrRP20. Byly syntetizovány jako modifikace přirozeného peptidu PrRP20, jelikož je to nejkratší fragment, u kterého byla potvrzena vysoká afinita k receptoru GPR10 i aktivita při *in vitro* experimentech srovnatelná s PrRP31 [54, 67]. Se zkracujícím se řetězcem již klesala afinita k receptoru a biologická aktivita byla také

nižší a to *in vitro* i *in vivo* [22, 54, 56]. Fenylalanin v pozici 31 byl nahrazen nekódovými aminokyselinami, většinou deriváty samotného fenylalaninu. Byly to aminokyseliny s objemným postranním aromatickým řetězcem: 1-Nal a 2-Nal, PheCl<sub>2</sub>, PheF<sub>5</sub> a PheNO<sub>2</sub>. U jednoho analogu byl fenylalanin nahrazen tyrosinem, u jednoho analogu pak tento C-koncový fenylalanin chyběl. Pro srovnání byly ještě syntetizovány peptidy s aminokyselinou bez aromatického postranního řetězce Cha a s Phg, který obsahoval aromatické jádro připojené bez postranního CH<sub>2</sub> raménka (Obr. 7) na str. 46. Všechny analogy měly zachován C-koncový amid, jelikož bez tohoto amidu by analogy ztratily biologickou aktivitu [8, 22]. Analogy byly navíc acetylovány na N-konci peptidového řetězce, aby byla zvýšena jejich stabilita, zvláště při experimentech *in vivo*.

## 5.2 POKUSY IN VITRO

Pro *in vitro* pokusy s novými analogy PrRP20 byla vybrána hypofyzární buněčná linie RC-4B/C, u které se přirozeně vyskytuje receptor GPR10 v počtu desetitisíců vazebných míst na buňku [54]. Využití hypofyzární buněčné linie pro *in vitro* experimenty je vhodné, jelikož i v organismu se velké množství receptorů GPR10 vyskytuje právě v hypofýze a vazba PrRP k hypofyzárnímu a hypothalamickému receptoru je téměř srovnatelná a je v řádu 10<sup>-9</sup> mol/l [8, 57]. Hypofyzární buněčné linie GH3 a AtT-20, u kterých byla také prokázána přítomnost receptoru GPR10, se neukázaly jako vhodné modely pro experimenty *in vitro*, jelikož při kompetitivních experimentech zde byla naměřena vyšší nespecifická vazba, způsobená nejspíše degradací peptidu ještě před vazbou na receptor [54].

Pomocí kompetitivních vazebných experimentů byla charakterizována vazba analogů PrRP20 k receptoru GPR10. Tyto vazebné experimenty byly prováděny za optimálních podmínek, kterými jsou 90 min inkubace při laboratorní teplotě ve vazebném pufru HEPES s pH 7,4, do kterého bylo přidáno BPTI v množství 0,1 mg/ml. BPTI brání rozštěpení peptidu na kratší neaktivní fragmenty [65]. Bylo zjištěno, že analogy PrRP20, [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20, [PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20 a [PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20 mají vysokou afinitu k receptoru, tj. velmi nízkou hodnotu  $K_i$ , v řádu 10<sup>-9</sup> mol/l, což jsou hodnoty řádově srovnatelné s hodnotami  $K_i$  pro PrRP31 a PrRP20 stanovené Langmeadem a kol. na buněčné linii HEK293 s transfectovaným receptorem GPR10, či Satohem a kol. na buněčných membránách získaných z potkaního hypothalamu či hypofýzy [57, 67]. Nízké hodnoty  $K_i$  naznačují, že u těchto analogů je zachována

vysoká afinita k receptoru. Vyšší, avšak stále uspokojivou hodnotu  $K_i$  v řádu  $10^{-8}$  mol/l měly analogy  $[1\text{-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[2\text{-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$ . Analogy  $[\text{Cha}^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[\text{desPhe}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$  již měly vyšší hodnotu  $K_i$  ( $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  a  $>10^{-4}$  mol/l), která naznačuje sníženou či zanedbatelnou afinitu k receptoru GPR10. Studie Boylea a kol. na analozích PrRP13 také ukázala, že záměna C-koncového fenylalaninu za Cha bez aromatického jádra nebo Phg bez postranní  $\text{CH}_2$  skupiny mezi aminoskupinou a aromatickým jádrem, vede ke snížení afinity k receptoru GPR10 a nižšímu biologickému účinku [55].

Prvním z funkčních experimentů prováděných s analogy PrRP20 bylo prokazování spouštění cytozolické signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 a jaderné signalizační dráhy CREB u hypofyzární buněčné linie RC-4B/C. Signalizační dráha MAPK/ERK1/2 je zahrnuta v aktivaci translace genu pro prolaktin [59], CREB nejspíše také [60]. Prokazování přítomnosti fosforylovaných proteinů, které dokazují, že signalizační dráha byla spuštěna, bylo prováděno pomocí metody Western blot s detekcí pomocí protilátek. 17 hodin před sběrem vzorků bylo vyměněno růstové médium pro RC-4B/C za médium bez séra a bez EGF, které spouští obě signalizační dráhy [61]. Fosforylaci proteinů signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 oproti kontrole významně zvyšovaly všechny analogy PrRP20 s výjimkou analogů  $[\text{Cha}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$ . Až na  $[\text{Phg}^{31}]\text{PrRP20}$  všechny analogy významně zvyšovaly fosforylaci CREB. Je tedy možné předpokládat, že analogy, u kterých byla zjištěna zvýšená fosforylace MAPK a CREB, se váží na receptor spřažený s G-proteinem, čímž spouští signalizační kaskádu a ovlivňují tak buněčné pochody.

Druhým funkčním testem bylo stanovení PRL uvolněného do média z hypofyzární buněčné linie RC-4B/C po působení analogů PrRP20. Výzkumy zjišťující vliv PrRP na stimulaci PRL přinášejí rozporuplné výsledky. Zvýšení uvolnění PRL bylo první zjištěnou funkcí PrRP [8]. Některé studie tyto závěry potvrzují, jiné zpochybňují [27]. Studie Maixnerové a kol. [54] potvrzuje výsledky Hinumy a kol. [8], které dokazují, že PrRP31 a PrRP20 zvyšují uvolnění PRL u hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, a že tato linie je vhodná ke zkoumání funkčnosti jednotlivých analogů [8, 54]. Dvě hodiny před pokusem bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra a bez EGF, u kterého bylo prokázáno, že snižuje uvolňování PRL do média vyvolané působením PrRP [33].  $EC_{50}$  byla stanovena v řádu  $10^{-9}$  mol/l u PrRP20 a analogů  $[\text{PheNO}_2^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[\text{PheCl}_2^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{PheF}_5^{31}]\text{PrRP20}$ , v řádu  $10^{-8}$  mol/l u  $[1\text{-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$ ,  $[2\text{-Nal}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{Tyr}^{31}]\text{PrRP20}$ . Vyšší hodnoty  $EC_{50}$  byly stanoveny u analogů  $[\text{Cha}^{31}]\text{PrRP20}$  a  $[\text{desPhe}^{31}]\text{PrRP20}$  ( $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  mol/l). Tyto

hodnoty jsou v souladu s nalezenými nižšími afinitami k receptoru GPR10. Analog [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 neovlivnil uvolnění PRL. Nízké hodnoty v řádu  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  mol/l jsou shodné s hodnotami, které ovlivnily uvolňování prolaktinu na primárních hypofyzárních buněčných kulturách ve studiích C. Spuche a kol. s analogem PrRP31 [33]. To poukazuje na dobrou funkčnost těchto nově syntetizovaných analogů a také na fakt, že buňky RC-4B/C jsou vhodným modelem pro testování analogů PrRP *in vitro*.

U analogu [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20, kterému chybí fenylalanin v pozici 31 na C-konci peptidu, bylo zkoumáno, zda nepůsobí jako antagonist PrRP20. K této hypotéze vedl fakt, že fenylalanin v pozici 31 je velmi důležitý pro vazbu na receptor, a tím i k vyvolání účinku PrRP. Při výše zmíněných *in vitro* experimentech vykazoval tento analog sníženou afinitu k receptoru GPR10 a nižší biologický účinek jak na spouštění signalizačních drah, tak na stimulaci uvolňování PRL. Prokazování antagonistického účinku vůči PrRP20 bylo prováděno metodou Western blot s detekcí fosforylovaného proteinu CREB pomocí protilátek. Bylo však zjištěno, že po společném působení PrRP20 a analogu [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 dochází k aditivnímu navýšení fosforylovaného proteinu CREB, což dokazuje, že analog [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 působí jako agonista PrRP20.

### 5.3 POKUSY IN VIVO

Díky pokusům, při kterých bylo zjištěno, že se PrRP vyskytuje v oblastech mozku důležitých v regulaci energetické bilance (DMN a PVN), a že množství mRNA pro PrRP je sníženo při negativní energetické bilanci (kojení, hladovění), se o PrRP začalo uvažovat jako o anorexigenním faktoru [28]. V četných studiích bylo potvrzeno, že PrRP snižuje příjem potravy po injektování do třetí mozkové komory potkanů i myší [42, 44, 53]. Tento účinek se zdá být pouze krátkodobý [54]. V některých studiích, i v naší laboratoři, byl zkoumán vliv na příjem potravy při IP podání PrRP. Bylo zjištěno, že periferní podání peptidu PrRP neovlivní příjem potravy, ani nepůsobí na zvýšení koncentrace PRL v krvi [54, 56]. Proto byl při našich studiích testován vliv PrRP na příjem potravy pouze po centrálním podání.

Ke sledování ovlivnění příjmu potravy byli využiti myši samci kmene C57Bl/6, kterým byla do třetí mozkové komory zavedena kanyla. Při dávce analogu 10 nmol/myš v 5  $\mu$ l fyziologického roztoku docházelo ke statisticky významnému snížení příjmu potravy u hladových jedinců po podání jak PrRP20, tak všech analogů, kromě analogů [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 a [Phg<sup>31</sup>]PrRP20. Jak je patrné z křivek na obrázku (Obr. 15 A, B, C) na

str. 47 a 48, snížení příjmu potravy je významné i po 5-ti hodinovém působení látek. Je tedy možné, že analogy PrRP20 mají delší účinek po jedné dávce, než samotné přirozeně se vyskytující analogy.

U analogů s nejvyšší anorexigenní aktivitou ([desPhe<sup>31</sup>]PrRP20, [1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20 a [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20) pak bylo testováno ovlivnění příjmu potravy i v nižších dávkách. Bylo zjištěno, že již při dávce 4 nmol/myš (v 5  $\mu$ l/myš) injektované do třetí mozkové komory došlo k významnému snížení příjmu potravy, což jsou výsledky srovnatelné se studiemi provedenými na potkanech a na myších při použití PrRP31 [44, 53]. Při dávce 1 nmol/myš v 5  $\mu$ l fyziologického roztoku docházelo ke snížení příjmu potravy pouze po podání analogu [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20. To odpovídá studiím provedených Bechtoldem a Luckmanem na myších samcích kmene C57Bl/6, u kterých po injektování PrRP31 do třetí mozkové komory v dávce 1 nmol/myš nedocházelo k významnému snížení potravy [53].

## 5.4 VZTAH MEZI STRUKTUROU A AKTIVITOU JEDNOTLIVÝCH ANALOGŮ PrRP20

Studie *in vitro* i *in vivo* ukazují, že [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 a [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 nejsou vhodnými funkčními analogy PrRP20. [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 má nejspíše sníženou aktivitu díky nepřítomnosti aromatického jádra na C-koncové aminokyselině v pozici 31, které je dle studie Boylea a kol. důležité pro vazbu na receptor, jelikož zřejmě určuje sterickou specifitu [55]. Analog [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 má sice zachované aromatické jádro, avšak aminokyselina fenylglycin postrádá ve své struktuře CH<sub>2</sub> skupinu, na které by bylo toto aromatické jádro vázáno. Naše experimenty tedy potvrzují pozorování Boylea a kol., který prokázal, že bez této uhlíkové skupiny, na které je navázáno aromatické jádro, nebude peptid aktivní [55].

Ostatní analogy, u kterých bylo aromatické jádro fenylalaninu v pozici 31 modifikováno fluorem, chlorem či NO<sub>2</sub> skupinou nebo u kterého byl fenylalanin vyměněn za tyrosin, měly zachovanou vysokou afinitu k receptoru GPR10 v řádu 10<sup>-8</sup> či 10<sup>-9</sup> mol/l. Biologický účinek byl srovnatelný nebo lepší, než účinek samotného PrRP20. Je také možné, že díky výskytu nekódové aminokyseliny na C-konci peptidu a acetylové skupině na N-konci peptidu, mají analogy zachovanou vyšší stabilitu a jejich účinek je delší.

Otázkou zůstává, proč je analog [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20, kterému chybí koncový fenylalanin v pozici 31, a který tedy postrádá aromatickou skupinu navázanou na CH<sub>2</sub>

skupině, tak účinný při experimentech *in vivo*, když i při pokusech *in vitro* byla prokázána snížená afinita k receptoru GPR10 i biologický účinek tohoto analogu. Jelikož peptid PrRP má velkou afinitu k receptoru pro NPFF [14], nabízí se hypotéza, že tento analog by mohl působit jak přes receptor GPR10, tak přes receptor pro NPFF. Je možné, že se váže i na jiné receptory v CNS. To bude také tématem našich dalších studií.

## 6 ZÁVĚR

---

1. Při experimentech *in vitro* na potkaní hypofyzární buněčné linii bylo prokázáno, že analogy s modifikacemi na C-koncovém fenyylalaninu: [PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20, [2-Nal<sup>31</sup>]PrRP20 a [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20 jsou plně funkční analogy PrRP20. Mají zachovanou vysokou afinitu k receptoru GPR10 v řádu 10<sup>-9</sup> či 10<sup>-8</sup> mol/l, která byla prokázána pomocí kompetitivních vazebných experimentů na hypofyzární buněčné linii RC-4B/C. Zároveň byla po působení těchto analogů prokázána biologická aktivita při experimentech dokazujících spouštění signalizačních drah MAPK/ERK1/2 a CREB a při stanovení prolaktinu uvolněného do média potkaní hypofyzární buněčné linie RC-4B/C. Analogy [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20, [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 a [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 se neosvědčily jako funkční analogy PrRP20. Byla u nich snížena afinita k receptoru GPR10, čímž byla způsobena i nižší biologická aktivita *in vitro* na buňkách RC-4B/C.

2. Při experimentech *in vivo* byly potvrzeny závěry z *in vitro* experimentů. Na snížení příjmu potravy po podání do třetí mozkové komory myším samcům kmene C57Bl/6 významně působily analogy [PheNO<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheCl<sub>2</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [PheF<sub>5</sub><sup>31</sup>]PrRP20, [1-Nal<sup>31</sup>]PrRP20, [2-Nal<sup>31</sup>]PrRP20 a [Tyr<sup>31</sup>]PrRP20. U analogů [Cha<sup>31</sup>]PrRP20 a [Phg<sup>31</sup>]PrRP20 nebylo pozorováno snížení příjmu potravy oproti kontrolním myším. Oproti očekávání však analog [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 významně snižoval příjem potravy a to už při velmi nízké dávce 1 nmol/myš.

V diplomové práci tedy byly splněny vytčené cíle. Výsledky budou využity ke studiu vztahu mezi analogem [desPhe<sup>31</sup>]PrRP20 a receptorem pro NPFF, jelikož je možné, že analog působí při snižování příjmu potravy právě přes tento receptor.

## 7 SEZNAM LITERATURY

---

1. Simpson K, Martin N, Bloom S: **Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**(2):120-128.
2. Meister B: **Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight.** *Physiol Behav* 2007, **92**(1-2):263-271.
3. Rolls ET: **Understanding the mechanisms of food intake and obesity.** *Obes Rev* 2007, **8 Suppl 1**:67-72.
4. Arora S, Anubhuti: **Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity-a review.** *Neuropeptides* 2006, **40**(6):375-401.
5. Dozio E, Ruscica M, Motta M, Magni P: **Hypothalamic neuropeptide systems as targets for potential anti-obesity drugs.** *Mini Rev Med Chem* 2007, **7**(1):11-19.
6. Strader A, Woods S: **Gastrointestinal hormones and food intake.** *Gastroenterology* 2005, **128**(1):175-191.
7. Bloom S: **Hormonal regulation of appetite.** *Obes Rev* 2007, **8 Suppl 1**:63-65.
8. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H *et al*: **A prolactin-releasing peptide in the brain.** *Nature* 1998, **393**(6682):272-276.
9. Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S: **Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP.** *Peptides* 2006, **27**(5):1073-1086.
10. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P: **Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors.** *Genomics* 1995, **29**(2):335-344.
11. Lagerström MC, Fredriksson R, Bjarnadóttir TK, Fridmanis D, Holmquist T, Andersson J, Yan YL, Raudsepp T, Zoorob R, Kukkonen JP *et al*: **Origin of the prolactin-releasing hormone (PRLH) receptors: evidence of coevolution between PRLH and a redundant neuropeptide Y receptor during vertebrate evolution.** *Genomics* 2005, **85**(6):688-703.
12. Dockray GJ: **The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour.** *Exp Physiol* 2004, **89**(3):229-235.
13. Bechtold DA, Luckman SM: **The role of RFamide peptides in feeding.** *J Endocrinol* 2007, **192**(1):3-15.
14. Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola J, Panula P: **Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **305**(3):825-832.
15. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M, Inoue K: **Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain.** *Endocrinology* 1999, **140**(5):2326-2333.



16. Lee Y, Yang S, Soares M, Voogt J: **Distribution of prolactin-releasing peptide mRNA in the rat brain.** *Brain Res Bull* 2000, **51**(2):171-176.
17. Matsumoto H, Murakami Y, Horikoshi Y, Noguchi J, Habata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M: **Distribution and characterization of immunoreactive prolactin-releasing peptide (PrRP) in rat tissue and plasma.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **257**(2):264-268.
18. Zhang X, Danila D, Katai M, Swearingen B, Klibanski A: **Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor messenger ribonucleic acid in normal human pituitary and pituitary adenomas.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(12):4652-4655.
19. Takahashi K, Yoshinoya A, Arihara Z, Murakami O, Totsune K, Sone M, Sasano H, Shibahara S: **Regional distribution of immunoreactive prolactin-releasing peptide in the human brain.** *Peptides* 2000, **21**(10):1551-1555.
20. Nieminen M, Brandt A, Pietilä P, Panula P: **Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat.** *Peptides* 2000, **21**(11):1695-1701.
21. Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, Inoue K: **Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):97-102.
22. Roland B, Sutton S, Wilson S, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander M, Lovenberg T: **Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery.** *Endocrinology* 1999, **140**(12):5736-5745.
23. Kataoka Y, Iijima N, Yano T, Kakihara K, Hayashi S, Hinuma S, Honjo H, Tanaka M, Ibata Y: **Gonadal regulation of PrRP mRNA expression in the nucleus tractus solitarius and ventral and lateral reticular nuclei of the rat.** *Brain Res Mol Brain Res* 2001, **87**(1):42-47.
24. Tokita R, Nakata T, Katsumata H, Konishi S, Onodera H, Imaki J, Minami S: **Prolactin secretion in response to prolactin-releasing peptide and the expression of the prolactin-releasing peptide gene in the medulla oblongata are estrogen dependent in rats.** *Neurosci Lett* 1999, **276**(2):103-106.
25. Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakihara K, Tanaka M, Hosoya M, Hinuma S: **Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain.** *Neurosci Res* 2000, **38**(3):223-230.
26. Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, Sekiguchi M, Kitada C, Kurokawa T, Nishimura O *et al*: **Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor.** *Regul Pept* 1999, **83**(1):1-10.
27. Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K: **Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo.** *Neuroendocrinology* 2000, **71**(4):262-267.
28. Lawrence C, Celsi F, Brennand J, Luckman S: **Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci* 2000, **3**(7):645-646.
29. Onaka T, Takayanagi Y, Leng G: **Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**(5):287-293.

30. Samson W, Resch Z, Murphy T, Chang J: **Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects.** *Endocrine* 1998, **9**(3):289-291.
31. Swinnen E, Boussemaere M, Denef C: **Stimulation and inhibition of prolactin release by prolactin-releasing Peptide in rat anterior pituitary cell aggregates.** *J Neuroendocrinol* 2005, **17**(6):379-386.
32. Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M: **Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **259**(2):321-324.
33. Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Alvarez-Crespo M, Mallo F: **Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo.** *Endocrine* 2007, **31**(2):119-124.
34. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, Higuchi T *et al*: **Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats.** *Neurosci Lett* 1999, **276**(3):193-196.
35. Matsumoto H, Maruyama M, Noguchi J, Horikoshi Y, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Inoue K *et al*: **Stimulation of corticotropin-releasing hormone-mediated adrenocorticotropin secretion by central administration of prolactin-releasing peptide in rats.** *Neurosci Lett* 2000, **285**(3):234-238.
36. Seal L, Small C, Dhillon W, Kennedy A, Ghatei M, Bloom S: **Prolactin-releasing peptide releases corticotropin-releasing hormone and increases plasma adrenocorticotropin via the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** *Neuroendocrinology* 2002, **76**(2):70-78.
37. Mera T, Fujihara H, Kawasaki M, Hashimoto H, Saito T, Shibata M, Saito J, Oka T, Tsuji S, Onaka T *et al*: **Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of stress responses in the brain through the hypothalamic paraventricular nucleus.** *Neuroscience* 2006, **141**(2):1069-1086.
38. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Fujino M, Inoue K: **Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system.** *Endocrinology* 2001, **142**(5):2032-2038.
39. Lin S, Leslie F, Civelli O: **Neurochemical properties of the prolactin releasing peptide (PrRP) receptor expressing neurons: evidence for a role of PrRP as a regulator of stress and nociception.** *Brain Res* 2002, **952**(1):15-30.
40. Laurent P, Becker J, Valverde O, Ledent C, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann S, Maldonado R, Vassart G, Parmentier M: **The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10.** *Nat Neurosci* 2005, **8**(12):1735-1741.
41. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F: **Neuroendocrine control of food intake.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008, **18**(2):158-168.
42. Lawrence C, Liu Y, Stock M, Luckman S: **Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **286**(1):R101-107.
43. Lawrence C, Ellacott K, Luckman S: **PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):360-367.

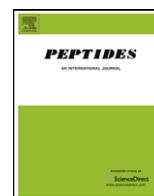
44. Ellacott K, Lawrence C, Rothwell N, Luckman S: **PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):368-374.
45. Ellacott K, Lawrence C, Pritchard L, Luckman S: **Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003, **285**(5):R1005-1010.
46. Walder K, de Silva A: **Leptin and the treatment of obesity.** *Drug Development Research* 2000:66-79.
47. Porte DJ, Baskin D, Schwartz M: **Leptin and insulin action in the central nervous system.** *Nutr Rev* 2002, **60**(10 Pt 2):S20-29; discussion S68-84, 85-27.
48. Moran T, Kinzig K: **Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(2):G183-188.
49. Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T: **Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents.** *J Clin Invest* 2008, **118**(12):4014-4024.
50. Bjursell M, Lennerås M, Göransson M, Elmgren A, Bohlooly-Y M: **GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**(3):633-638.
51. Mochiduki A, Takeda T, Kaga S, Inoue K: **Stress response of prolactin-releasing peptide knockout mice as to glucocorticoid secretion.** *J Neuroendocrinol* 2010.
52. Gu W, Geddes B, Zhang C, Foley K, Stricker-Krongrad A: **The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice.** *J Mol Neurosci* 2004, **22**(1-2):93-103.
53. Bechtold D, Luckman S: **Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice.** *Endocrinology* 2006, **147**(10):4723-4729.
54. Maixnerová J, Spolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Rezáčová M, Zelezná B, Maletínská L: **Characterization of prolactin-releasing peptide: Binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** *Peptides* 2011, **32**(4):811-817.
55. Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S: **Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide.** *J Pept Sci* 2005, **11**(3):161-165.
56. Beck B, Max J, Richy S, Stricker-Krongrad A: **Feeding response to a potent prolactin-releasing peptide agonist in lean and obese Zucker rats.** *Brain Res* 2004, **1016**(1):135-138.
57. Satoh F, Smith D, Gardiner J, Mahmoodi M, Murphy K, Ghatei M, Bloom S: **Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat--evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle.** *Br J Pharmacol* 2000, **129**(8):1787-1793.
58. Hurbain-Kosmath I, Berault A, Noel N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, Leiter E, Beamer W, Bedigian H, Davisson M: **Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1990, **26**(5):431-440.
59. Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, Hisamoto K, Morishige K, Hinuma S, Kurachi H *et al*: **Prolactin-releasing peptide**

- activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 2000, **275**(5):3667-3674.
60. Hayakawa J, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hisamoto K, Mabuchi S, Hinuma S, Murata Y: **Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):13-22.
  61. Shaywitz AJ, Greenberg ME: **CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:821-861.
  62. Tashjian AJ, Yasumura Y, Levine L, Sato G, Parker M: **Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone.** *Endocrinology* 1968, **82**(2):342-352.
  63. Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, Blechová M, Zelezná B, Slaninová J, Maletínská L: **Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments.** *Peptides* 2007, **28**(10):1945-1953.
  64. Motulsky H, Neubig R: **Analyzing radioligand binding data.** *Curr Protoc Neurosci* 2002, **Chapter 7**:Unit 7.5.
  65. Špolcová A: **Vazebné studie peptidů jako potenciálních látek pro léčbu obezity.** Karlova Universita, Přírodovědecká fakulta; 2009.
  66. Cheng Y, Prusoff WH: **Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction.** *Biochem Pharmacol* 1973, **22**(23):3099-3108.
  67. Langmead C, Szekeres P, Chambers J, Ratcliffe S, Jones D, Hirst W, Price G, Herdon H: **Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor.** *Br J Pharmacol* 2000, **131**(4):683-688.

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

---

1. Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Rezáčová M, Zelezná B, Maletínská L: **Characterization of prolactin-releasing peptide: Binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** *Peptides* 2011, **32**(4):811-817.



## Characterization of prolactin-releasing peptide: Binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor

Jana Maixnerová<sup>a</sup>, Andrea Špolcová<sup>a</sup>, Miroslava Pýchová<sup>a</sup>, Miroslava Blechová<sup>a</sup>,  
Tomáš Elbert<sup>a</sup>, Martina Řezáčová<sup>b</sup>, Blanka Železná<sup>a</sup>, Lenka Maletínská<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 October 2010

Received in revised form 6 December 2010

Accepted 14 December 2010

Available online 23 December 2010

#### Keywords:

PrRP  
Pituitary cell lines  
Binding  
MAPK/ERK1/2  
Prolactin  
Food intake

### ABSTRACT

The recently discovered prolactin-releasing peptide (PrRP) binds to the PrRP receptor and is involved in endocrine regulation and energy metabolism. However, its main physiological role is currently unknown. Two biologically active isoforms of PrRP exist: the 31 (PrRP31) and the 20 (PrRP20) amino acid forms, which both contain a C-terminal Phe amide sequence. In the present study, the PrRP receptor was immunodetected in three rodent tumor pituitary cell lines: GH3, AtT20 and RC-4B/C cells. The saturation binding of radioiodinated PrRP31 to intact cells demonstrated a  $K_d$  in the  $10^{-9}$  M range and a  $B_{max}$  in the range of tens of thousands binding sites per cell. For binding to RC-4B/C cells, both PrRP31 and PrRP20 competed with  $^{125}$ I-PrRP31 with a similar  $K_i$ . The C-terminal analog PrRP13 showed lower binding potency compared to PrRP31 and PrRP20. All PrRP analogs increased the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 (mitogen-activated phosphatase/extracellular-regulated kinase) and CREB (cAMP response element-binding protein) in RC-4B/C cells. Additionally, prolactin release was induced by the PrRP analogs in a dose-dependent manner in RC-4B/C cells. Finally, food intake after intracerebroventricular administration of PrRP analogs in fasted mice was followed. Both PrRP31 and PrRP20 decreased food intake, but PrRP13 did not show significant effect. Studies on pituitary cell lines expressing the PrRP receptor are more physiologically relevant than those on cells transfected with the receptor. This cell type can be used as a model system for pharmacological studies searching for PrRP antagonists and stable effective PrRP agonists, as these drugs may have potential as anti-obesity agents.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Prolactin-releasing peptide (PrRP) was identified as an endogenous ligand of the orphan human G-protein-coupled receptor GPR10 (also hGR3, rat UHR-1) by reverse pharmacology [14]. The name of this peptide reflects the fact that PrRP was found to stimulate the secretion of prolactin (PRL) in primary pituitary cells from lactating rats, the rat cell line RC-4B/C [14] and in vivo in rats [27]. PrRP-mediated PRL secretion was later questioned and is not currently considered to be the primary function of PrRP [40].

On the other hand, growing evidence points to PrRP involvement in the control of food intake and body weight [22]. Centrally administered PrRP was shown to inhibit food intake and body weight gain in rats and mice [23,2]. Intracerebroventricular (i.c.v.)

coadministration of PrRP and long-term acting regulator of energy balance leptin in rats resulted in additive reductions in nocturnal food intake and body weight gain and an increase of energy expenditure [10]. Recently, both PrRP and well-known short-term anorexigenic peptide cholecystokinin (CCK) were shown to have no influence on food intake in GPR10 receptor knockout mice. This finding suggested that PrRP acting through its receptor might be a key mediator in the central satiating action of CCK [2]. Furthermore, both PrRP receptor- and PrRP-deficient mice displayed late-onset obesity [5,38].

PrRP is also implicated in the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, blood pressure and nociception (for reviews, see [37,38]).

PrRP belongs to a family of RF-amide peptides that contain an Arg–Phe-amide motif in their C-terminus (for reviews, see [40,37,30,12]). It has two molecular isoforms of either 31 (PrRP31) or 20 (PrRP20) amino acids with an identical C-terminal sequence and equipotent biological activity [31]. The C-terminal 13-peptide of PrRP31 has been shown to confer full biological potency to PrRP31 in vitro [6]. The C-terminal PrRP (25–31) heptapeptide was found to be the minimal active agonist structure [31,6,3], and the

\* Corresponding author at: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic. Tel.: +420 220183525; fax: +420 220183571.

E-mail address: [maletin@uochb.cas.cz](mailto:maletin@uochb.cas.cz) (L. Maletínská).

C-terminal Phe amide is of critical importance for biological activity [14].

PrRP is mostly expressed in the medulla oblongata, brainstem and hypothalamus [31,11,16]. The PrRP receptor has been shown to localize in the thalamus, hypothalamus, nucleus tractus solitarius, anterior pituitary and the adrenal medulla [31,1].

The current understanding of the functional binding of PrRP to its receptor is limited, mainly because PrRP antagonists have not been found and functional tests of PrRP analogs are scarce. PrRP-specific binding has been determined only in cells transfected with the PrRP receptor [14,31,6,21] or in isolated cell membranes [34].

Kimura et al. [20] showed that PrRP can activate extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK1/2) in GH3 cells, while Hayakawa et al. [13] suggested that PrRP activated a PI3K-protein kinase B/Akt in order to induce the PRL promoter via a CREB (cAMP response element-binding protein)-dependent mechanism.

In the present study, we studied the binding and function of three PrRP analogs in three rodent pituitary cell lines that express the PrRP receptor. Studies of PrRP in physiologically relevant cell lines can better elucidate the role of PrRP in the organism. Finally, food intake after intracerebroventricular administration of PrRP in fasted mice was also followed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Na<sup>125</sup>I was from MP Biomedicals (Illkirch, France) and IODO-GEN<sup>TM</sup> from Pierce (Rockford, IL, USA).

### 2.2. Peptides

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and corticotrophin-releasing hormone (CRH) was from NeoMPS (Strasbourg, France). PrRP peptides were synthesized at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, by solid-phase synthesis using the Fmoc strategy on the ABI433A synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by Maixnerová et al. [24]. The following peptides were synthesized:

PrRP31 (SRAHQHSMETRPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub>), PrRP20 (TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub>) and PrRP13 (WYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub>). PrRP31 was iodinated at Tyr<sup>20</sup> either with Na<sup>125</sup>I or non-radioactive NaI using IODO-GEN<sup>TM</sup> according to manufacturer's instructions. The purification was accomplished on Agilent Prep-C18 5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); gradient elution from 10% B to 20% B in 5 min and then to 30% B in 60 min (A, water with 0.1% TFA; B, acetonitrile with 0.1% of TFA). The molecular weights of the non-radioactive iodinated peptides were determined by MALDI-TOF Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The specific activity of <sup>125</sup>I-PrRP31 was about 2000 Ci/mmol. The radiolabeled peptide was kept in aliquots at  $-20^{\circ}\text{C}$  and used for binding studies within 1 month.

### 2.3. Cell culture

Three pituitary cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). RC-4B/C cells [15] were grown in DMEM medium, pH 7.4, supplemented with 10% fetal bovine serum and 2.5 ng/ml epidermal growth factor (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA). AtT20 cells [8] were grown in DMEM medium, pH 7.4, supplemented with 10% horse serum. GH3 cells [39] were grown in HAMS F-10 medium, pH 7.4, supplemented with 15% horse serum and 2.5% fetal bovine serum. To all media, L-glutamine was added to a final concentration

of 2 mM, and streptomycin/penicillin was added to a concentration of 1% (all media and reagents were from PAA, Cölbe, Germany). All cells were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 95% air/5% CO<sub>2</sub>. Medium was changed every 2–3 days and cells were subcultured as required.

### 2.4. Detection of PrRP receptor by Western blotting

Cell lines RC-4B/C, GH3, and AtT20 were maintained in 75 cm<sup>2</sup> flasks for 7 days, and the medium was changed every 2 days. Cells were washed three times with washing buffer (10 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>) and then lysed in lysis buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% glycerol, 0.01% (w/v) bromphenol blue and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). The lysates were centrifuged at 2000  $\times$  g/min for 10 min. Protein content in the supernatant was then determined by the Bradford assay [7]. Aliquots of the cell lysates were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

For Western blotting, equal numbers of cells were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels, and separated proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As a positive control, lysates of Jurkat cells were used (a gift from L. Sedláčková, 3rd Faculty of Medicine, Charles University). After blocking with 5% non-fat milk, the membrane was incubated with rabbit polyclonal anti-GPR10 antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; 1:1000) at room temperature for 1 h. Anti-rabbit IgG goat peroxidase-conjugated antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:20,000) was applied to the membrane for 1 h at room temperature. The membrane was developed with SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions and detected with a CCD camera Las-3000 (Fujifilm Life Science, USA). The relative density of immunostained bands was quantified using Quantity One software version 4.6.1. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 2.5. Binding to intact plated cells

For binding studies, cells were seeded on polyethylene imine (PEI)-coated 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). To reach the density about of  $4 \times 10^5$  cells/well, which was found to be optimal for binding experiments, cells were allowed to grow for 3 days.

Saturation and competition binding experiments were performed according to [28]. Plated cells were incubated with 0.5–6 nM <sup>125</sup>I-PrRP31 in saturation experiments or with 0.1 nM <sup>125</sup>I-PrRP31 and  $10^{-11}$ – $10^{-5}$  M non-radioactive ligand in competitive binding experiments. Experiments were performed in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 60 min at  $25^{\circ}\text{C}$ . Nonspecific binding was determined using PrRP31 at a concentration of  $10^{-5}$  M. After incubation, cells were washed with washing buffer and then solubilized in 0.1 M NaOH. Bound radioactivity was determined by  $\gamma$ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Non-specific binding amounted to less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in duplicate at least three times.

### 2.6. Detection of MAPK/ERK1/2 and CREB phosphorylation by Western blotting

Cell lines RC-4B/C, GH3, and AtT20 were plated on PEI-coated 6-well plates (IWAKI, Lennox Lab Supplies, Dublin, Ireland) at  $8 \times 10^5$  cells/well and grown in complete medium for 2 days. Then, 20 h before an experiment, the medium was exchanged for the appropriate serum-free medium. The next day, the cells were incubated with  $10^{-5}$  M PrRP31, PrRP20 or PrRP13, or  $10^{-5}$  M PMA,



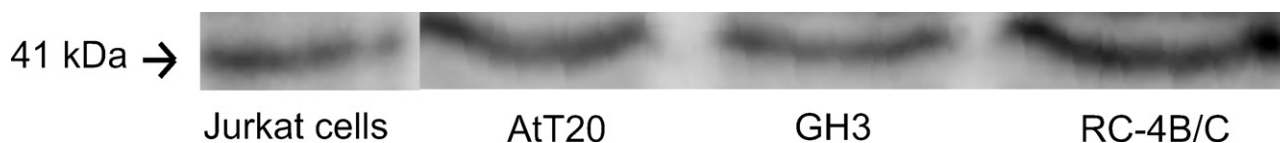


Fig. 1. Immunodetection of the PrRP receptor in Western blots of AtT20, GH3 and RC-4B/C cell lysates. Jurkat cells were used as a positive control.

which was used as a positive control, for 5 or 30 min at 37 °C. The cells were then washed three times with cold phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and pH 7.4) and lysed for 5 min in lysis buffer (see Section 3.3; with 5 mM orthovanadate and 50 mM NaF) on ice. Aliquots of the cell lysates were stored at –20 °C. For Western blotting, lysates of equal numbers of cells were subjected to electrophoresis using 12% SDS-PAGE gels. For protein transfer, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was used (Sigma, St. Louis, USA). After blocking with 5% non-fat milk supplemented with 5 mM sodium orthovanadate and 50 mM NaF, the membrane was incubated with the appropriate primary antibody (Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) mouse mAb, diluted 1:2000, or p44/42 MAPK mouse mAb, diluted 1:2000; phospho-CREB (Ser133) mouse mAb or CREB mouse mAb, diluted 1:2000; all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) at room temperature for 1 h. Anti-mouse IgG rabbit peroxidase-conjugated antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:12,000) was applied at room temperature for 1 h. The membranes were then developed as described in Section 3.3.

### 2.7. Determination of pituitary hormone release in medium

RC-4B/C, GH3 and AtT20 cells were plated on PEI-coated 24-well plates to reach a cell density of about  $5 \times 10^5$  cells/well in 3 days. The medium of GH3 and RC-4B/C was exchanged for the appropriate serum-free medium 2 h before the experiment with the exception of AtT20 cells for which the medium was exchanged 20 h before the experiment. GH3 and RC-4B/C cells were incubated with TRH at a final concentration of  $10^{-5}$  M or a PrRP analog at a final concentration of  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  M for 1 h at 37 °C. AtT20 cells were incubated with CRH or PrRP31 at a final concentration of  $10^{-5}$  M for 3 h at 37 °C. The medium was then collected, centrifuged at  $2000 \times g$  for 5 min, and stored in aliquots at –20 °C. Pituitary hormones GH, PRL, ACTH, luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured in a diluted medium using the MILLIPLEX<sup>TM</sup> MAP Rat pituitary kit assay (Millipore, St. Charles, MO, USA) according to the manufacturer's recommended protocol. Prolactin in the medium from RC-4B/C cells was determined with an RIA assay kit (Izotop, Budapest, Hungary) according to the manufacturer's recommended protocol.

### 2.8. Food intake experiments

Male C57Bl/6 mice from AnLab (Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00). They were given ad libitum water and standard chow diet (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992.

At the age of 16 weeks, mice were implanted with cannulas into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described earlier [25]. Animals were placed into separate cages and allowed to recover from the surgery for at least seven days before being used in the experiment. Before starting the food intake experiment, the mice were randomly divided into groups of

6–8 mice and were fasted overnight (17 h) with free access to water. On the day of the experiment at 8:00, mice were injected i.c.v. with 5 µl of either saline or PrRP31, PrRP20 or PrRP13 at a dose of 10 nmol/mouse (dissolved in saline) ( $n=6$ –8).

Fifteen min after i.c.v. injection, mice were given weighed food pellets. Food consumption was followed every 30 min for 5 h. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed. The placement of the cannula was verified histologically after the experiment.

### 2.9. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as means  $\pm$  S.E.M. Saturation and competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA), comparing the best fit for single binding site models ( $K_d$ ,  $B_{max}$  and  $IC_{50}$  values were obtained from non-linear regression analysis). Inhibition constants ( $K_i$ ) were calculated from  $IC_{50}$  values using the Cheng–Prusoff equation [9].

Data from cell signaling and hormone release, as well as food intake experiments were analyzed by one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey's post hoc test using Graph-Pad Software;  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Detection of GPR10 receptor by Western blotting

The presence of the GPR10 receptor in the GH3, RC-4B/C, and AtT20 cell lines was verified by Western blotting. Antibody against the rat PrRP receptor GPR10 recognized a band of 41 kDa in all three cell lines similar to that in Jurkat cell lysates, which were used as a positive control (see Fig. 1).

### 3.2. Optimization of binding experiments

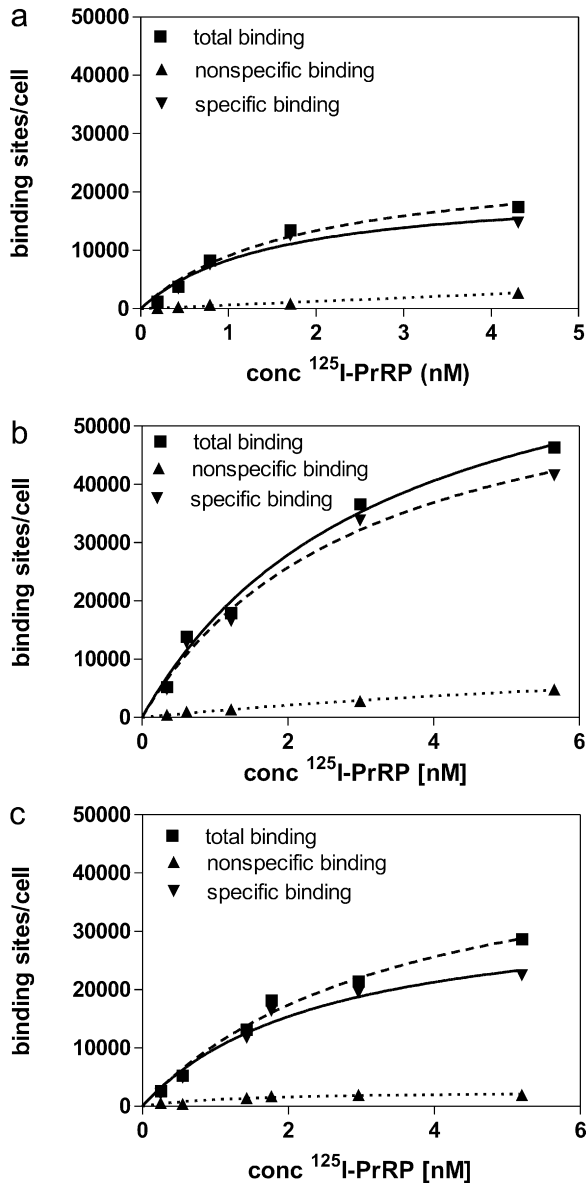
In GH3, RC-4B/C, and AtT20 cells, the specific binding of [<sup>125</sup>I]-PrRP31 at 25 °C was linear from  $1.5$  to  $5 \times 10^5$  cells/well. It reached a maximum at 45 min and remained constant for at least the next 60 min. The specific binding at 4 °C reached the maximum at 90 min and was constant for 2 h of incubation; the non-specific binding at this temperature, however, amounted to 40% of the total binding. The specific binding at 37 °C was constant from 20 to 45 min of incubation, but the non-specific binding was higher than 50%, most likely due to peptide degradation. The presence of EDTA, EGTA, or Ca<sup>2+</sup> in the binding buffer did not affect specific binding (results not shown).

After optimization of binding conditions, a 60 min incubation at 25 °C with  $4 \times 10^5$  cells/well (plated intact cells) was routinely used.

### 3.3. Saturation binding of [<sup>125</sup>I]-PrRP31 to GH3, RC-4B/C and AtT20 cells

The saturable specific binding of [<sup>125</sup>I]-PrRP31 to GH3 cells gave a  $K_d$  of  $5.72 \pm 1.08$  nM and a  $B_{max}$  of  $88,300 \pm 12,100$  binding sites/cell. The non-specific binding was lower than 11%. Non-linear





**Fig. 2.** <sup>125</sup>I-PrRP31 saturation binding to (a) AtT20, (b) GH3 and (c) RC-4B/C intact cells on plates (in all experiments,  $4 \times 10^5$  cells/well were used). The cells were incubated at 25 °C for 60 min with increasing concentrations of <sup>125</sup>I-PrRP31 in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of  $10^{-5}$  M PrRP31. Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from the total binding. Binding curves were plotted using non-linear regression. The figure is a representative example of at least three experiments carried out in duplicate.

regression analysis indicated the presence of one binding site (see Fig. 2b). The saturable specific binding of <sup>125</sup>I-PrRP31 to RC-4B/C cells gave a  $K_d$  of  $4.21 \pm 0.66$  nM and a  $B_{max}$  of  $67,400 \pm 14,500$  binding sites/cell. The non-specific binding was less than 7%. Non-linear regression analysis indicated the presence of one binding site (see Fig. 2c). The specific binding of <sup>125</sup>I-PrRP31 to AtT20 cells was saturable, with non-specific binding less than 22%, a  $K_d$  of  $3.97 \pm 1.38$  nM and a  $B_{max}$  of  $22,800 \pm 1100$  binding sites/cell (Fig. 2a).

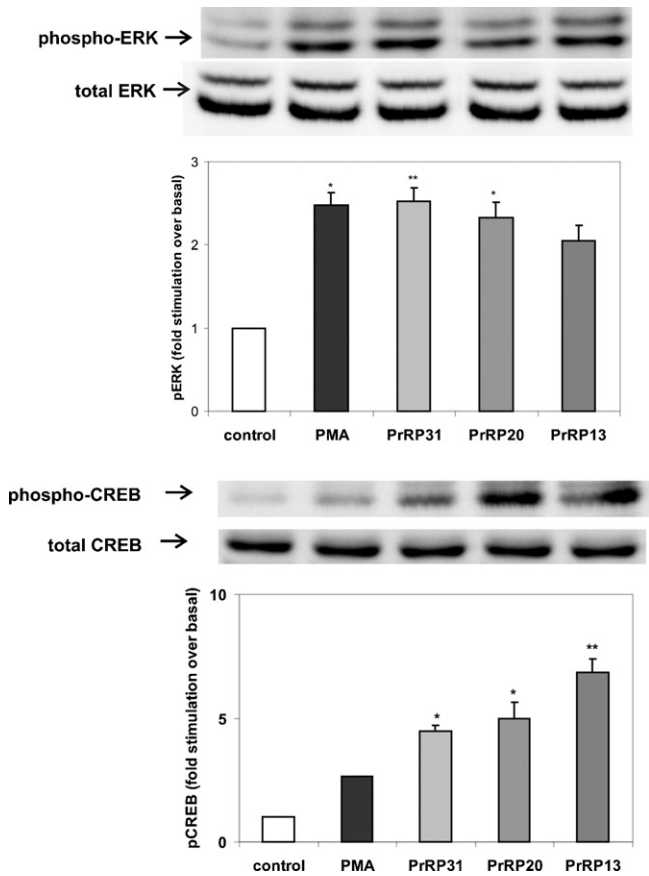
3.4. Competitive binding of PrRP to RC-4B/C cells

PrRP31, PrRP20 and I-PrRP31 competed with <sup>125</sup>I-PrRP31 for binding to RC-4B/C cells with a  $K_i$  in the nM range, as summarized in Table 1. PrRP13 had a  $K_i$  in the  $10^{-7}$  M range (Table 1).

**Table 1**  
Displacement of <sup>125</sup>I-PrRP31 binding to RC-4B/C cells by PrRP analogs.

Peptide	$K_i$ (nM)
PrRP31	$4.52 \pm 0.79 \times 10^{-9}$
PrRP20	$3.20 \pm 1.24 \times 10^{-9}$
I-PrRP31	$3.66 \pm 0.49 \times 10^{-9}$
PrRP13	$4.84 \pm 2.35 \times 10^{-7}$

Mean  $\pm$  S.E.M. of three to five separate experiments.;  $K_i$  was calculated using the Cheng–Prusoff equation (concentration of the radioligand was 0.1 nM and the  $K_d$  taken from saturation experiments was 4.21 nM).

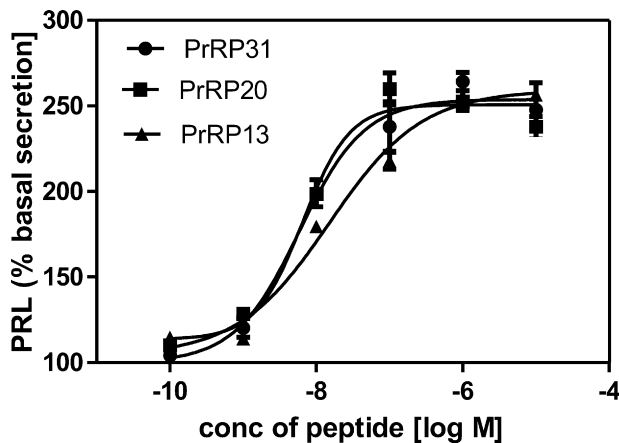


**Fig. 3.** Characterization of PrRP receptor-induced MAPK/ERK and CREB phosphorylation. RC-4B/C cells were grown and treated as described in Section 2 and stimulated with PMA or PrRP analogs for 5 min at 37 °C. Subsequently, cells were lysed, and MAPK/ERK or CREB phosphorylation was determined by immunoblotting. Detection with total (unphosphorylated) MAPK/ERK or CREB antibody was performed to verify the total amount of MAPK/ERK or CREB protein. Data are the means  $\pm$  S.E.M. of at least three independent experiments carried out in duplicate. The phosphorylation level in control cells was normalized to 1. Statistically significant differences to control are indicated (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

3.5. PrRP effect on MAPK/ERK1/2 and CREB phosphorylation

To examine the effect of PrRP analogs on cell signaling, MAPK/ERK1/2 phosphorylation and CREB phosphorylation were determined in RC-4B/C cells. Five-minute incubations resulted in a significant increase in phosphorylated protein and a lower background compared to 30-min incubations (results not shown). Therefore 5-min incubations were routinely used. PMA was used as a positive control both for the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 [29] and CREB [19].

PrRP31, PrRP20, and PrRP13 stimulated phosphorylation of both MAPK/ERK1/2 and CREB, however, with different potencies, as shown in Fig. 3. PrRP31 and PrRP20 increased phosphorylation of both MAPK/ERK1/2 and CREB significantly. PrRP13 increased



**Fig. 4.** PrRP analog-induced PRL production by RC-4B/C cells. RC-4B/C cells were grown and treated as described in Section 2 and incubated with the indicated concentrations of PrRP analogs for 1 h. Supernatants of the culture media were collected and PRL concentrations were measured by RIA assay. The results shown are representative of those obtained from three independent experiments carried out in duplicate.

phosphorylation of CREB significantly but did not increase phosphorylation of MAPK/ERK1/2 significantly.

### 3.6. Effect of PrRP on the release of pituitary hormone in vitro

The ability of PrRP analogs to stimulate the release of pituitary hormones from three pituitary cell lines was tested using the MILLIPLEX rat pituitary kit assay. Serum-starved pituitary cells were stimulated for 1–3 h at 37 °C with PrRP31 or standards (TRH for prolactin release in GH3 cells and CRH for ACTH release in AtT20 cells), and secreted hormones were measured. From all pituitary cells and hormones tested (GH3 cells for GH and PRL release, AtT20 cells for ACTH release and RC-4B/C cells for all anterior pituitary hormones release), only PRL from RC-4B/C was robustly secreted after 1 and 3 h of PrRP31 stimulation (results not shown).

In RC-4B/C cells, RIA was used for quantification of the PRL release after stimulation of cells at various concentrations of PrRP31, PrRP20 and PrRP13 (see Fig. 4). The  $EC_{50}$  values determined by non-linear regression analysis were as follows:  $(5.90 \pm 1.43) \times 10^{-9}$  M for PrRP31,  $(6.52 \pm 1.10) \times 10^{-9}$  M for PrRP20 and  $(1.51 \pm 1.35) \times 10^{-8}$  M for PrRP13.

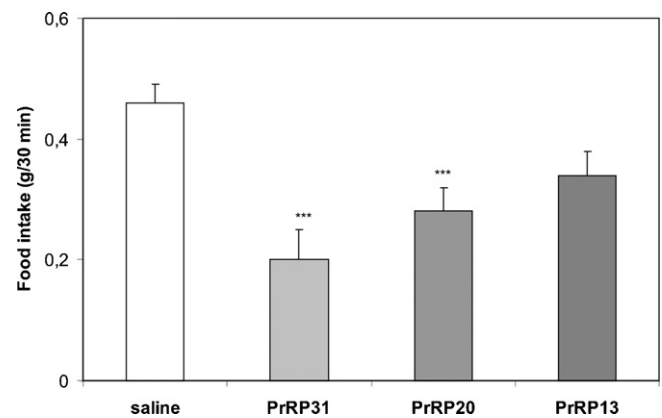
### 3.7. Food intake experiments

The food intake after i.c.v. administration of PrRP31, PrRP20 and PrRP13 is shown in Fig. 5. Forty-five min after injection, the decrease in food intake after administration of PrRP31 and PrRP20 was significant ( $P < 0.001$ ), but PrRP13 did not show significant anorexigenic activity at the dose tested, i.e., 10 nmol/mouse.

## 4. Discussion

Prolactin-releasing peptide, originally associated with a role in prolactin release, is now considered to have other important physiological functions in mammalian organisms. These include the secretion of other hormones, the inhibition of food intake and the increase of energy expenditure.

While the absence of a PrRP antagonist hinders the identification of the physiological role of PrRP, and data concerning the functional binding of PrRP analogs are scarce [31,6], we decided to perform this study with PrRP receptor-expressing cells, which are the best system for PrRP functional binding studies.



**Fig. 5.** Effect of PrRP analogs on food intake of fasted mice. All peptides were administered i.c.v. in a dose of 10 nmol/mouse. Food intake was monitored 45 min after injection and is expressed in grams of food consumed per mouse. Significance is \*\*\* $P < 0.001$  versus the respective saline-treated group ( $n = 6-8$ ).

In our study, the binding and functional characterization of two naturally occurring PrRP analogs (PrRP31 and PrRP20, and C-terminal fragment PrRP13) were determined in three rodent pituitary cell lines: mouse AtT20 adenocorticotrophs, rat GH3 cells containing somatotrophs and lactotrophs, and rat RC-4B/C cells containing somatotrophs, lactotrophs, adenocorticotrophs and gonadotrophs. In all three lines, we demonstrated the presence of the PrRP receptor by immunodetection on Western blots.

In cells with transfected GPR10 [14,31] or UHR-1 [14,21], the specific binding of  $^{125}$ I-PrRP31 was characterized with  $K_d$ 's in the pM and nM ranges. Rat membranes from the hypothalamus and pituitary specifically bound  $^{125}$ I-PrRP31 with a  $K_d$  in the nM range [34]. In this study, in all pituitary cell lines that endogenously express the PrRP receptor, the  $K_d$  was in the nM range, which is typical for receptors and their endogenous ligands [28]. All three pituitary cell lines showed a quite high but reasonable [28]  $B_{max}$  in the tens of thousands of binding sites per cell, which made them suitable for further competitive binding and functional studies.

The binding potency of the three PrRP analogs was compared using competitive binding assays in RC-4B/C cells. PrRP31 and PrRP20 showed equipotent binding affinity to RC-4B/C cells with a  $K_i$  in the nM range, similar to that described in the literature [31]. On the other hand, PrRP13 was able to displace  $^{125}$ I-PrRP binding with a  $K_i$  of only two orders of magnitude lower. Finally, displacement of  $^{125}$ I-PrRP binding by I-PrRP proved that [ $^{125}$ I]-radiolabeling did not change the pharmacological properties of PrRP.

The PrRP receptor was first reported to be involved in the release of prolactin but not other hormones from rat pituitary cells, both primary and RC-4B/C, with a similar potency as TRH [14]. However, later studies demonstrated that PrRP was less active than TRH or vasoactive intestinal peptide (VIP) in both pituitary cell aggregates and in vivo [32,41]. The potency of PrRP to release PRL was questioned because of the fact that in the median eminence, where classical hypophysiotropic hormones are released to the portal blood, PrRP immunoreactive fibers were not detected [26,18]. Moreover, PrRP was found only to increase PRL in response to TRH [36] but not to directly affect prolactin secretion in rat primary pituitary cells [33] or in vivo [18]. Therefore, it was suggested that PRL release was not a primary function of PrRP [40]. On the other hand, in human prolactin-secreting pituitary adenomas, PrRP was linked to GH secretion but not to PRL release [32]. In rats, centrally injected PrRP was also found to cause the release of GH, LH, and ACTH via modulatory action on hypothalamic hypophysiotropic neurons [35,17].

Due to the contradictory reports on the effects of PrRP on hormone secretion in the pituitary, we screened all hormones that could be induced by PrRP31 in three pituitary cell lines by MILLIPLEX rat pituitary panels. Of all three lines used, the only robust and significant response to PrRP31 was PRL release from rat RC-4B/C cells, in agreement with the effect described in the original study by Hinuma et al. [14].

RIAs indicated that all three PrRP analogs stimulated prolactin release from RC-4B/C cells with comparable potency in a dose-dependent manner and with an EC<sub>50</sub> in the 10<sup>-9</sup>–10<sup>-8</sup> M range.

A downstream effect of neurotransmitters involved in the regulation of energy metabolism acting on G-protein coupled receptor (such as PrRP) usually involves MAPK/ERK1/2 activation preceding CREB-mediated gene transcription [4]. PrRP was shown to stimulate both MAPK/ERK1/2 [20] and CREB [13] phosphorylation in GH3 cells in order to elicit PRL promoter activity in GH3 cells. In our study, we found an equal potency of PrRP31 and 20 to activate both MAPK/ERK1/2 (in the cytosol) and CREB signaling (nuclear) (PrRP13 stimulated significantly only CREB signaling) and to stimulate PRL release in RC-4B/C cells. Thus, CREB may play a role in the signaling via MAPK/ERK1/2 in the action of PrRP in lactotrophs.

Intracerebroventricular administration of PrRP31 (4 nmol/mouse) inhibited both fast-induced and nocturnal feeding in C57Bl mice. The effect was strongest up to 2 h after injection [2]. In our experiment, we confirmed the central anorexigenic effect of PrRP31 in fasted mice at a dose of 10 nmol/mouse. PrRP20 showed a decrease in food intake comparable with PrRP31, with a maximal effect at 45 min after injection and duration up to 2 h. On the other hand, PrRP13 did not show any significant effect on food intake compared with saline treated group. These results are in agreement with a lower affinity of PrRP13 in our *in vitro* tests. Intraperitoneal injection of PrRP13 (10 mg/kg) stimulated food intake in rats but its central injection had no effect [3]. However, the PrRP13 effect was not compared with that of PrRP31 in the study mentioned. In our experiments, peripheral injections of all three PrRP analogs had no effect on food intake in fasted mice (results not shown).

In conclusion, three rodent pituitary tumor-derived cell lines were shown to possess high levels of the PrRP receptor, both by immunodetection and saturation specific binding with K<sub>d</sub>'s in the nM range. The rat RC-4B/C cell line was especially universal in binding and functional studies with the PrRP analogs. PrRP31 and PrRP20 were equipotent in binding to these cells, while PrRP13 showed lower binding potency. All three PrRP analogs stimulated prolactin release and CREB signaling very effectively and with comparable potency. However, only PrRP31 and PrRP20 had a significant central anorexigenic effect, as well as the effect on stimulation of MAPK/ERK1/2. Thus, PrRP20 rather than PrRP13 was approved as a basic analog for future structure–activity studies aimed at designing a stable high affinity analog of PrRP.

Our study demonstrates that cell lines endogenously expressing the PrRP receptor can serve as relevant physiological models that are a compromise between recombinant cell lines and primary cell preparations. These lines may be useful for elucidating the functions of PrRP.

The importance of PrRP in food intake regulation is extraordinary. PrRP not only mediates central actions of CCK but has its own anorexigenic potency [2,22,23]. The fact that both PrRP and PrRP knock-out mice are hyperphagic and develop late-onset obesity proves the unique anorexigenic properties of PrRP. Designing and evaluation *in vitro* and *in vivo* of PrRP analogs in order to find potent and long lasting analog(s) with selective anorexigenic properties and searching for antagonists would contribute to finding the mechanism and possible treatment of obesity and metabolic syndrome.

## Acknowledgements

This study was supported by grant Agency of the Czech Republic no. P303/10/1368 and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

We gratefully acknowledge the generous help of M. Šanda for providing the mass spectra, H. Vysušílová for excellent technical assistance and J. Jahodová and R. Pavlovičová from the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague for pituitary hormone measurement by MILLIPLEX.

## References

- [1] Abe T, Koga N, Tomita M, Tonoike T, Kushima M, Takahashi K, et al. Cellular localization of prolactin-releasing peptide receptors in the human pituitary. *Acta Neuropathol* 2003;106:495–500.
- [2] Bechtold D, Luckman S. Prolactin-releasing peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology* 2006;147:4723–9.
- [3] Beck B, Max J, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to a potent prolactin-releasing peptide agonist in lean and obese Zucker rats. *Brain Res* 2004;1016:135–8.
- [4] Berthoud H, Sutton G, Townsend R, Patterson L, Zheng H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 2006;89:517–24.
- [5] Bjursell M, Lennéräs M, Göransson M, Elmgren A, Bohlooly YM. GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:633–8.
- [6] Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S. Structure–activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19–31)-peptide. *J Pept Sci* 2005;11:161–5.
- [7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [8] Buonassisi V, Sato G, Cohen A. Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:1184–90.
- [9] Chang C, Cheng Y. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 1978;27:2297–300.
- [10] Ellacott K, Lawrence C, Rothwell N, Luckman S. PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology* 2002;143:368–74.
- [11] Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, et al. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul Pept* 1999;83:1–10.
- [12] Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRP. *Peptides* 2006;27:1073–86.
- [13] Hayakawa J, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, et al. Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. *Endocrinology* 2002;143:13–22.
- [14] Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, et al. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998;393:272–6.
- [15] Hurbain-Kosmath I, Beraut A, Noel N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, et al. Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:431–40.
- [16] Ibaty Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakiyama K, Tanaka M, Hosoya M, et al. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. *Neurosci Res* 2000;38:223–30.
- [17] Iijima N, Matsumoto Y, Yano T, Tanaka M, Yamamoto T, Kakiyama K, et al. A novel function of prolactin-releasing peptide in the control of growth hormone via secretion of somatostatin from the hypothalamus. *Endocrinology* 2001;142:3239–43.
- [18] Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K. Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release *in vivo*. *Neuroendocrinology* 2000;71:262–7.
- [19] Ji L, Mochon E, Arcinas M, Boxer L. CREB proteins function as positive regulators of the translocated bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 1996;271:22687–91.
- [20] Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, et al. Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275:3667–74.
- [21] Langmead C, Szekeres P, Chambers J, Ratcliffe S, Jones D, Hirst W, et al. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol* 2000;131:683–8.
- [22] Lawrence C, Celsi F, Brennand J, Luckman S. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 2000;3:645–6.
- [23] Lawrence C, Ellacott K, Luckman S. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* 2002;143:360–7.
- [24] Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Šanda M, et al. Structure–activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 2007;28:1945–53.

- [25] Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007;559:109–14.
- [26] Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, et al. Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology* 1999;140:2326–33.
- [27] Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S, et al. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:321–4.
- [28] Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 2002; Chapter 7:Unit 7.5.
- [29] Nanzer A, Khalaf S, Mozid A, Fowkes R, Patel M, Burrin J, et al. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 2004;151:233–40.
- [30] Onaka T, Takayanagi Y, Leng G. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:287–93.
- [31] Roland B, Sutton S, Wilson S, Luo L, Pyati J, Huvar R, et al. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 1999;140:5736–45.
- [32] Rubinek T, Hadani M, Barkai G, Melmed S, Shimon I. Prolactin (PRL)-releasing peptide stimulates PRL secretion from human fetal pituitary cultures and growth hormone release from cultured pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2826–30.
- [33] Samson W, Resch Z, Murphy T, Chang J. Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects. *Endocrine* 1998;9:289–91.
- [34] Satoh F, Smith D, Gardiner J, Mahmoodi M, Murphy K, Ghatei M, et al. Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat—evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 2000;129:1787–93.
- [35] Seal L, Small C, Kim M, Stanley S, Taheri S, Ghatei M, et al. Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats. *Endocrinology* 2000;141:1909–12.
- [36] Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Alvarez-Crespo M, Mallo F. Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo. *Endocrine* 2007;31:119–24.
- [37] Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul Pept* 2005;126:27–33.
- [38] Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, et al. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:4014–24.
- [39] Tashjian AJ, Yasumura Y, Levine L, Sato G, Parker M. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* 1968;82:342–52.
- [40] Taylor M, Samson W. The prolactin releasing peptides: RF-amide peptides. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1206–15.
- [41] Watanobe H, Schiöth H, Wikberg J, Suda T. Evaluation of the role for prolactin-releasing peptide in prolactin secretion induced by ether stress and suckling in the rat: comparison with vasoactive intestinal peptide. *Brain Res* 2000;865:91–6.